

531, 316

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 4 月 29 日 (29.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/035817 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12Q 1/60,  
1/26, 1/32, 1/44, G01N 33/92, C07J 1/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/013259

(22) 国際出願日: 2003 年 10 月 16 日 (16.10.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2002-301328  
2002 年 10 月 16 日 (16.10.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和  
メデックス株式会社 (KYOWA MEDEX CO., LTD.)  
[JP/JP]; 〒104-0042 東京都中央区入船二丁目 1 番  
1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 片山 有基  
(KATAYAMA, Yuki) [JP/JP]; 〒411-0932 静岡県駿東郡  
長泉町南一色字上山地 600 番 1 協和メデックス  
株式会社 協和メデックス研究所内 Shizuoka (JP). 藤  
中 真由美 (FUJINAKA, Mayumi) [JP/JP]; 〒411-0932  
静岡県駿東郡長泉町南一色字上山地 600 番 1  
協和メデックス株式会社 協和メデックス研究所内  
Shizuoka (JP). 森山 聡 (MORIYAMA, Satoshi) [JP/JP];  
〒510-8502 三重県四日市市大協町二丁目 3 番地 協  
和油化株式会社 四日市研究所内 Mie (JP). 村田 繁

(MURATA, Shigeru) [JP/JP]; 〒510-8502 三重県四日  
市市大協町二丁目 3 番地 協和油化株式会社 四日  
市研究所内 Mie (JP).

(74) 代理人: 岩橋 和幸 (IWAHASHI, Kazuyuki); 〒100-8185  
東京都千代田区大手町一丁目 6 番 1 号 協和醸酵工  
業株式会社 知的財産室 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,  
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,  
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI,  
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,  
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,  
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD AND REAGENT FOR MEASURING CHOLESTEROL IN HIGH-DENSITY LIPOPROTEINS

(54) 発明の名称: 高密度リポ蛋白中のコレステロールの測定方法および試薬

(57) Abstract: A method of measuring cholesterol in high-density lipoproteins characterized by comprising reacting a specimen with cholesterol ester hydrolase and cholesterol oxidase, or cholesterol ester hydrolase, an oxidized coenzyme and cholesterol dehydrogenase in an aqueous medium containing a bile acid derivative and then measuring the thus formed hydrogen peroxide or reduced coenzyme; and a reagent to be used therein.

(57) 要約: 検体と、コレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素、または、コレステロールエステル加水分解酵素、酸化型補酵素およびコレステロール脱水素酵素とを、胆汁酸誘導体を含む水性媒体中で反応させ、生成した過酸化水素または還元型補酵素を測定することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロールの測定方法およびそれに用いる試薬。

WO 2004/035817 A1

## 明 細 書

### 高密度リポ蛋白中のコレステロールの測定方法および試薬

#### 技術分野

本発明は、検体中の高密度リポ蛋白（以下、HDLと略記する）中のコレステロールの測定方法、測定用試薬、測定用キット、新規胆汁酸誘導体および新規胆汁酸誘導体の製造方法に関する。

#### 背景技術

生体中リポ蛋白は、その比重により高密度リポ蛋白（HDL）、低密度リポ蛋白（以下、LDLと略記する）、超低密度リポ蛋白（以下、VLDLと略記する）、カイロミクロン（以下、CMと略記する）に分類されており、それぞれ主にアポ蛋白の種類の違いによって生体中での働きが大きく異なっており、脂質組成もさまざまである。その中で、HDLは、動脈壁を含めた各組織からコレステロールを受け取るために細胞内に蓄積したコレステロールの除去作用に関係し、冠動脈硬化症をはじめとする各種動脈硬化症の危険予防因子であり、その血中レベルは動脈硬化性疾患の発症予知の有用な指針となることが知られている。

従来のHDL中のコレステロール（以下、HDLコレステロールと略記する）の測定法は、超遠心法、免疫化学的方法、電気泳動法、沈殿法等による分画操作とコレステロール定量操作の2段階からなる。しかしながら、分画操作は、操作が煩雑であり、長時間を要するものであり、また、安全性の点でも問題があった。従って、これらの分離操作を伴う測定法は極めて効率が悪く、実用化に適さない方法であった。

近年、上記の問題を解決するための種々の測定法が開発されている。例えば、HDL以外のリポ蛋白を凝集させる測定法として、デキストラン硫酸等のHDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬、2価の金属塩、および、化学的に修飾された酵素を用いる測定法（特開平8-131197号公報）、ポリアニオン等のHDL以外のリポ蛋白と複合体を形成する試薬と、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン縮合物等のリポ蛋白を溶解しない界面活

性剤とを用いる測定法（特開平 8-201393 号公報）、デキストラン硫酸等のポリアニオン、2価の金属塩、特定の非イオン性界面活性剤および試料由来のアルブミンとは別異のアルブミンとを用いる測定法（特開平 9-285298 号公報）等が知られている。また、血清または血漿を、リポ蛋白分画剤（デキストラン硫酸等のポリアニオンとマグネシウムイオン等の 2 価陽イオンとの組み合わせ）を含む溶液で処理し、得られた混合液を固体および液体の分離処理することなく、アニオン性界面活性剤（アルキルスルホン酸または胆汁酸もしくはその誘導体）の存在下に、コレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼと反応させ、生成した過酸化水素を測定することを特徴とする血清または血漿中の HDL コレステロールを測定する方法（特開平 8-116996 号公報）も知られている。

しかしながら、これらの HDL 以外のリポ蛋白を凝集させる HDL コレステロール測定法においては、従来の基準法と良好な相関性があるものの、反応で生成する凝集物による濁りに起因する不正確性、反応セルのアルカリ洗浄の際に、反応液中の金属塩との反応で生成する金属水酸化物の析出による自動分析装置への過度の負荷という問題がある。

また、HDL 以外のリポ蛋白を凝集させない測定法として、アシルポリオキシエチレンソルビタンエステルにより HDL 以外のリポ蛋白中のコレステロールを優先的に過酸化水素へ変換し、生成した過酸化水素を消去した後、ポリオキシエチレンアルキルエーテルの添加により、HDL コレステロールを酵素的に測定する方法（特開平 9-299 号公報）、生体試料と、膵臓由来のコレステロールエステラーゼと、コレステロールオキシダーゼと、コール酸等の胆汁酸とを、アルブミンが存在する条件下で接触させ、HDL コレステロールと当該酵素との反応により消費される化合物または生成される化合物を測定することを特徴とする HDL コレステロールの測定方法（国際公開第 97/40376 号パンフレット）等が知られている。

しかしながら、これらの HDL 以外のリポ蛋白を凝集させない HDL コレステロール測定法においては、HDL 以外のリポ蛋白中のコレステロールの

不完全な消去や、HDL以外のリポ蛋白中のコレステロールに対する非特異反応に起因する測定値の不正確性が問題となる場合がある。

胆汁酸類を用いるHDLコレステロール測定法としては、前記の特開平8-116996号公報や国際公開第97/40376号パンフレットに記載された方法の他に、例えば血清または血漿を、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ、および、胆汁酸塩もしくは胆汁酸誘導体もしくはジオクチルスルホサクシネートを含有する緩衝液中で当該酵素と反応させ、VLDLおよびLDL中のコレステロールをHDLコレステロールに先駆けて反応させ、生成した過酸化水素を測定した後、非イオン系のポリオキシエチレンオキシド基含有界面活性剤を反応液に添加し、HDLコレステロールと当該酵素とを反応させ、HDLコレステロールを特異的に分別定量する方法（特開昭62-69999号公報）、血清を、特定のpHおよび特定の温度の下、膵臓由来のコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ、胆汁酸群の界面活性剤、および、非イオン系界面活性剤を含有する緩衝液中で当該酵素と反応させることによりHDLコレステロールを測定する方法（特開昭63-126498号公報）、生体試料を、アルブミンおよび胆汁酸もしくはその塩の存在下に、膵臓由来のコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼに接触させ、HDLコレステロールを当該酵素と反応させた後、処理された生体試料を微生物由来のコレステロールエステラーゼと接触させ、LDLコレステロールを当該酵素（微生物由来のコレステロールエステラーゼとコレステロールオキシダーゼ）と反応させることにより、HDLコレステロールおよびLDLコレステロールを測定する方法（特開平11-9300号公報）、リポ蛋白を含有する試料を、胆汁酸誘導体および／または両性界面活性剤の存在下に酵素（コレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼ）と反応させ、HDLコレステロールを選択的に反応させた後、ポリオキシエチレン鎖を有する非イオン性界面活性剤を反応液に添加し、HDLコレステロールを選択的に反応させることにより、HDLコレステロールおよび／またはLDLコレステロ



ールを測定する方法（特開 2000-325097 号公報）等が知られている。しかしながら、これらの測定法は、測定に長時間を要する場合があります、また、必ずしも、HDL コレステロールに特異的な測定法ではなかった。

オキシエチレン基をエステル部分に有するコール酸のエステルは公知であるが（特開平 5-221941 号公報）、当該エステルを用いた HDL コレステロールの測定法は知られていない。

エステル化合物の合成方法としては、一般的に、カルボン酸とアルコールとの縮合反応により合成する方法が簡便であり、特に酸触媒を用いる共沸エステル化法がよく利用されている。しかしながら、嵩高い置換基や水溶性基もつ化合物では収率が低いことがある（シー・ケー・インゴールド (C. K. Ingold) 著, 「ストラクチャー・アンド・メカニズム・イン・オーガニック・ケミストリー (Structure and Mechanism in Organic Chemistry)」 (英国), 第 2 版, ベル (Bell) 1969 年, 15 章, p. 1128-1178)。例えば、前記の特開平 5-221941 号公報には、酸触媒として p-トルエンスルホン酸を用いたコール酸とジエチレングリコールモノメチルエーテルとの反応によるコール酸エステルの合成方法が記載されているが、72 時間という長時間の加熱還流を行っても、コール酸エステルの収率は 23% と極めて低く、また、後処理操作も複雑で煩雑である。

また、分子内に水酸基をもつようなカルボン酸では自己エステル化も進行するため、分子内の水酸基を保護してアルコールとのエステル化を行う方法も用いられている。例えば、ウルソデコール酸と 2-ヒドロキシエチルオキシグルコシドとを用いたウルソデコール酸エステルの合成方法が知られているが（特開平 11-199598 号公報）、本方法は、1) ウルソデコール酸の水酸基を TBDMS (t-ブチルジメチルシリル) 基で保護する工程、2) エステル化工程、および、3) 脱保護 (TBDMS 基の除去) 工程を含有する方法であるため簡便な合成法とは言い難い。

#### 発明の開示

本発明の目的は、検体中の高密度リポ蛋白中のコレステロールを簡便かつ正確に測定するための方法、ならびに、その方法に使用する測定試薬および測定キットを提供することにある。

本発明は、下記〔１〕～〔４２〕に関する。

〔１〕 検体と、コレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素、または、コレステロールエステル加水分解酵素、酸化型補酵素およびコレステロール脱水素酵素とを、胆汁酸誘導体を含有する水性媒体中で反応させ、生成した過酸化水素または還元型補酵素を測定することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロールを測定する方法。

〔２〕 水性媒体が、さらに、アルブミンを含有する〔１〕記載の方法。

〔３〕 コレステロールエステル加水分解酵素が、化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素である〔１〕または〔２〕記載の方法。

〔４〕 化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素が、ポリエチレングリコールを主成分とする基、ポリプロピレングリコールを主成分とする基、ポリプロピレングリコールとポリエチレングリコールの共重合体を有する基、水溶性多糖類を含有する基、スルホプロピル基、スルホブチル基、ポリウレタン基、および、キレート機能を有する基からなる群より選ばれる基により修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素である

〔３〕記載の方法。

〔５〕 化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素が、ポリエチレングリコールを主成分とする基により修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素である〔３〕記載の方法。

〔６〕 胆汁酸誘導体が、陰イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体である〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の方法。

〔７〕 陰イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体が、コール酸もしくはその塩、タウロコール酸もしくはその塩、グリココール酸もしくはその塩、リトコール酸もしくはその塩、デオキシコール酸もしくはその塩、ケノデオキシコール酸もしくはその塩、ウルソデオキシコール酸もしくはその塩、

7-オキシリトコール酸もしくはその塩、12-オキシリトコール酸もしくはその塩、12-オキシケノデオキシコール酸もしくはその塩、7-オキシデオキシコール酸もしくはその塩、ヒオコール酸もしくはその塩、ヒオデオキシコール酸もしくはその塩、および、デヒドロコール酸もしくはその塩からなる群より選ばれる胆汁酸誘導体である〔6〕記載の方法。

〔8〕 胆汁酸誘導体が、両性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体である〔1〕～〔5〕のいずれかに記載の方法。

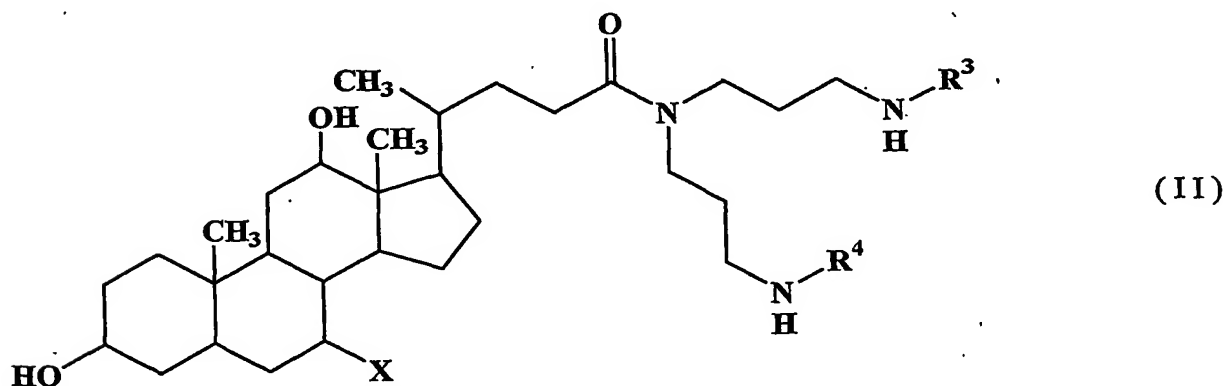
〔9〕 両性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体が、一般式（I）



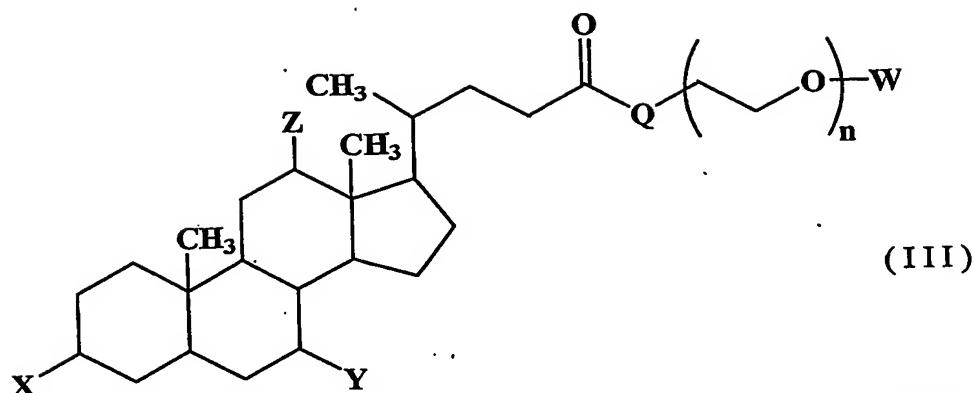
〔式中、 $R^1$ は、3-（3-コラミドプロピル）ジメチルアンモニオ基であり、 $R^2$ は、水素原子または水酸基である〕で表される化合物である〔8〕記載の方法。

〔10〕 胆汁酸誘導体が、非イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体である〔1〕～〔5〕のいずれかに記載の方法。

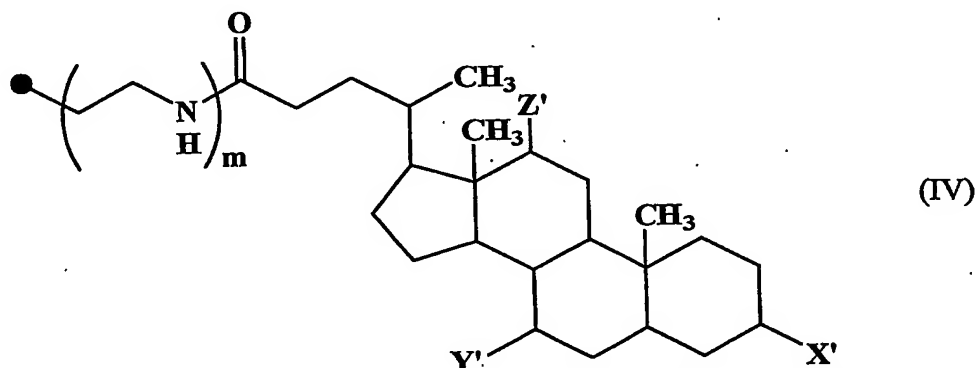
〔11〕 非イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体が、一般式（I）



（Xは、水素原子または水酸基を表し、 $R^3$ および $R^4$ は、同一または異なって、置換もしくは非置換のアルキル基、または、置換もしくは非置換のアルカノイル基を表す）で表される化合物、または、一般式（I I I）



{式中、X、YおよびZは、同一または異なって、水素原子、水酸基またはオキシ(=O)基を表し、Qは、酸素原子またはNHを表し、Wは、水素原子、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、アルカノイル基、アルケノイル基、アルキノイル基、置換もしくは非置換のアリール基、置換もしくは非置換のアミノアルキル基、または、一般式(IV)}



[式中、X'、Y'およびZ'は、同一または異なって、水素原子、水酸基またはオキシ(=O)基を表し、mは、0または1を表す]で表される基を表し、nは、3~400の整数を表す}で表される化合物である[10]記載の方法。

[12] コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、胆汁酸誘導体および過酸化水素測定用試薬を含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用試薬。

[13] コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、胆汁酸誘導体および酸化型補酵素を含有することを特徴とする高密度

リポ蛋白中のコレステロール測定用試薬。

[14] さらに、還元型補酵素測定用試薬を含有する[13]記載の試薬。

[15] さらに、アルブミンを含有する[12]～[14]のいずれかに記載の試薬。

[16] コレステロールエステル加水分解酵素が、化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素である[12]～[15]のいずれかに記載の試薬。

[17] 化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素が、ポリエチレングリコールを主成分とする基、ポリプロピレングリコールを主成分とする基、ポリプロピレングリコールとポリエチレングリコールの共重合体を有する基、水溶性多糖類を含有する基、スルホプロピル基、スルホブチル基、ポリウレタン基、および、キレート機能を有する基からなる群より選ばれる基により修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素である[16]記載の試薬。

[18] 化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素が、ポリエチレングリコールを主成分とする基により修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素である[16]記載の試薬。

[19] 胆汁酸誘導体が、陰イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体である[12]～[18]のいずれかに記載の試薬。

[20] 陰イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体が、コール酸もしくはその塩、タウロコール酸もしくはその塩、グリココール酸もしくはその塩、リトコール酸もしくはその塩、デオキシコール酸もしくはその塩、ケノデオキシコール酸もしくはその塩、ウルソデオキシコール酸もしくはその塩、7-オキシリトコール酸もしくはその塩、12-オキシリトコール酸もしくはその塩、12-オキシケノデオキシコール酸もしくはその塩、7-オキシデオキシコール酸もしくはその塩、ヒオコール酸もしくはその塩、ヒオデオキシコール酸もしくはその塩、および、デヒドロコール酸もしくはその

塩からなる群より選ばれる胆汁酸誘導体である〔19〕記載の試薬。

〔21〕 胆汁酸誘導体が、両性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体である〔12〕～〔18〕のいずれかに記載の試薬。

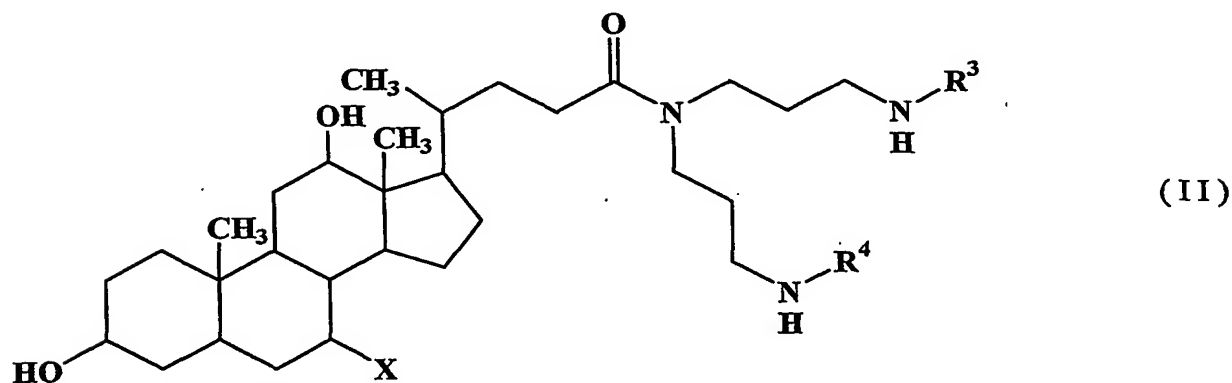
〔22〕 両性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体が、一般式（I）



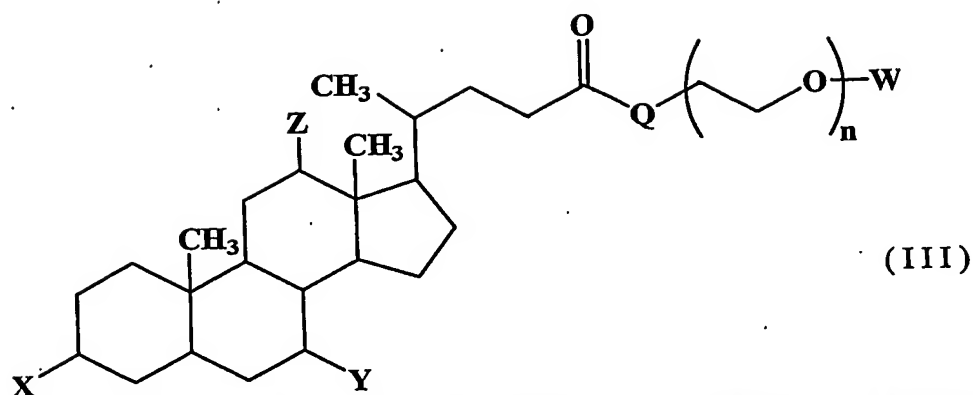
〔式中、 $\text{R}^1$ は、3-（3-コラミドプロピル）ジメチルアンモニオ基であり、 $\text{R}^2$ は、水素原子または水酸基である〕で表される化合物である〔21〕記載の試薬。

〔23〕 胆汁酸誘導体が、非イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体である〔12〕～〔18〕のいずれかに記載の試薬。

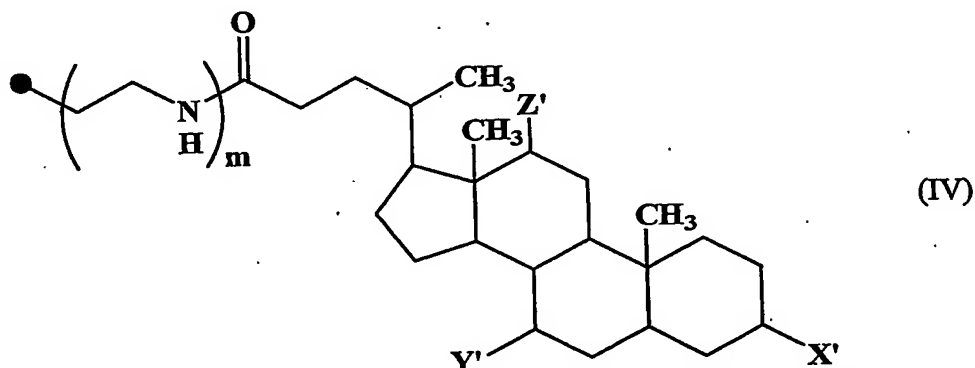
〔24〕 非イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体が、一般式（I）



（Xは、水素原子または水酸基を表し、 $\text{R}^3$ および $\text{R}^4$ は、同一または異なつて、置換もしくは非置換のアルキル基、または、置換もしくは非置換のアルカノイル基を表す）で表される化合物、または、一般式（I I I）



{式中、X、YおよびZは、同一または異なって、水素原子、水酸基またはオキシ(=O)基を表し、Qは、酸素原子またはNHを表し、Wは、水素原子、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、アルカノイル基、アルケノイル基、アルキノイル基、置換もしくは非置換のアリール基、置換もしくは非置換のアミノアルキル基、または、一般式(IV)}



[式中、X'、Y'およびZ'は、同一または異なって、水素原子、水酸基またはオキシ(=O)基を表し、mは、0または1を表す]で表される基を表し、nは、3~400の整数を表す}で表される化合物である[23]記載の試薬。

[25] コレステロールエステル加水分解酵素を含有する第一試薬と、コレステロール酸化酵素を含有する第二試薬とを含有し、胆汁酸誘導体および過酸化水素測定用試薬を第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

[26] 胆汁酸誘導体を含有する第一試薬と、コレステロールエステル

加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素を含有する第二試薬とを含有し、過酸化水素測定用試薬を第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

〔27〕 過酸化水素測定用試薬を含有する第一試薬と、コレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素を含有する第二試薬とを含有し、胆汁酸誘導体を第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

〔28〕 コレステロールエステル加水分解酵素を含有する第一試薬と、コレステロール脱水素酵素を含有する第二試薬とを含有し、胆汁酸誘導体および酸化型補酵素を第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

〔29〕 胆汁酸誘導体を含有する第一試薬と、コレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール脱水素酵素を含有する第二試薬とを含有し、酸化型補酵素を第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

〔30〕 さらに、還元型補酵素測定用試薬を、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有する〔28〕または〔29〕記載のキット。

〔31〕 さらに、アルブミンを、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有する〔25〕～〔30〕のいずれかに記載のキット。

〔32〕 コレステロールエステル加水分解酵素が、化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素である〔25〕～〔31〕のいずれかに記載のキット。

〔33〕 化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素が、ポリエチレングリコールを主成分とする基、ポリプロピレングリコールを主成分とする基、ポリプロピレングリコールとポリエチレングリコールの共重合体を有する基、水溶性多糖類を含有する基、スルホプロピル基、スルホブチル基、ポリウレタン基、および、キレート機能を有する基からなる群より選ばれる基により修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素である



〔32〕記載のキット。

〔34〕 化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素が、ポリエチレングリコールを主成分とする基により修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素である〔32〕記載のキット。

〔35〕 胆汁酸誘導体が、陰イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体である〔25〕～〔34〕のいずれかに記載のキット。

〔36〕 陰イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体が、コール酸もしくはその塩、タウロコール酸もしくはその塩、グリココール酸もしくはその塩、リトコール酸もしくはその塩、デオキシコール酸もしくはその塩、ケノデオキシコール酸もしくはその塩、ウルソデオキシコール酸もしくはその塩、7-オキシリトコール酸もしくはその塩、12-オキシリトコール酸もしくはその塩、12-オキシケノデオキシコール酸もしくはその塩、7-オキシデオキシコール酸もしくはその塩、ヒオコール酸もしくはその塩、ヒオデオキシコール酸もしくはその塩、および、デヒドロコール酸もしくはその塩からなる群より選ばれる胆汁酸誘導体である〔35〕記載のキット。

〔37〕 胆汁酸誘導体が、両性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体である〔25〕～〔34〕のいずれかに記載のキット。

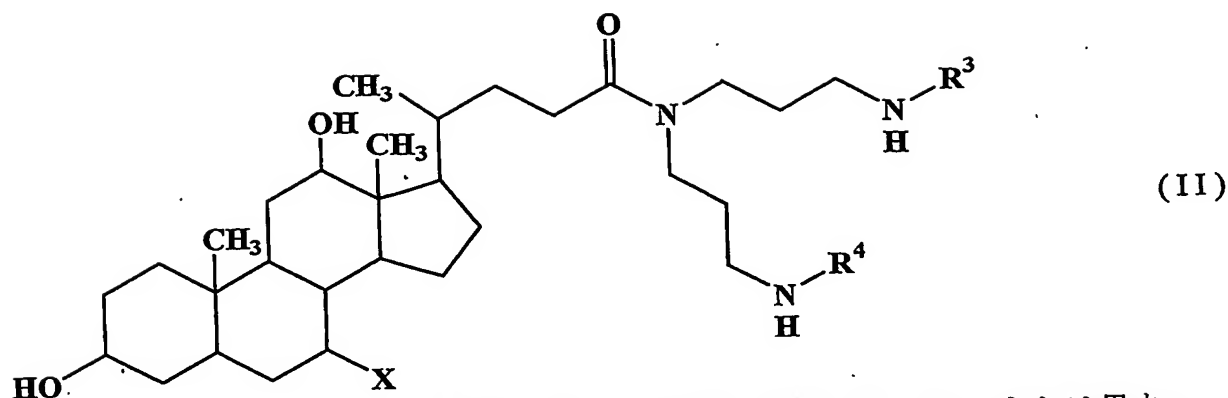
〔38〕 両性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体が、一般式 (I)



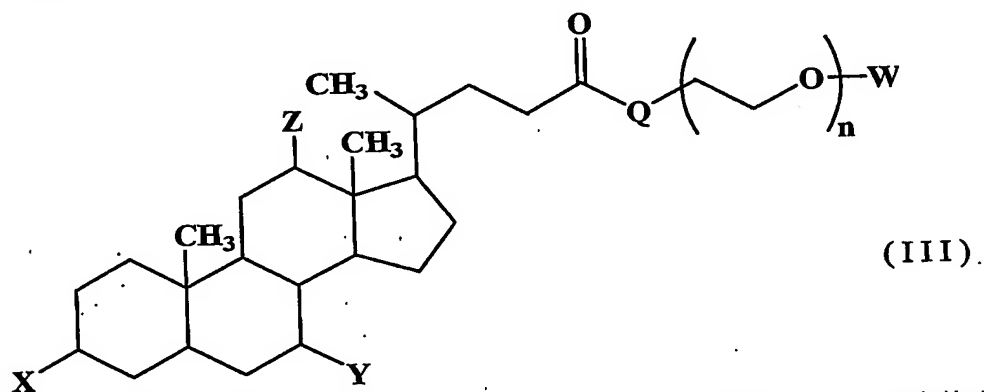
〔式中、 $R^1$ は、3-(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ基であり、 $R^2$ は、水素原子または水酸基である〕で表される化合物である〔37〕記載のキット。

〔39〕 胆汁酸誘導体が、非イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体である〔25〕～〔34〕のいずれかに記載のキット。

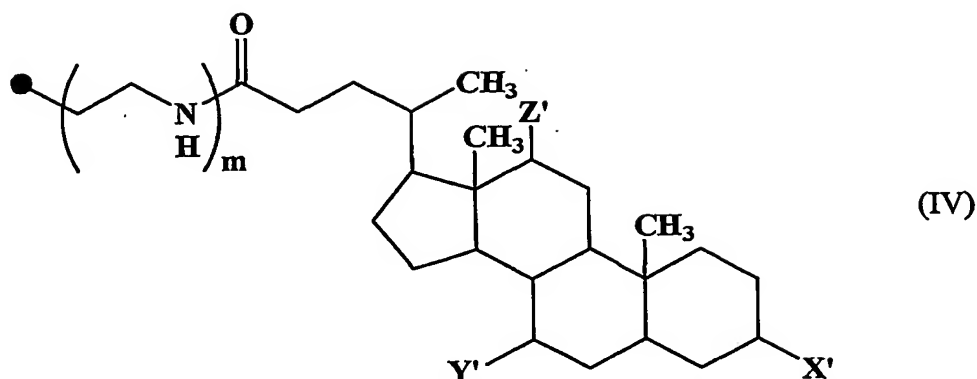
〔40〕 非イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体が、一般式 (I)



(Xは、水素原子または水酸基を表し、 $R^3$ および $R^4$ は、同一または異なって、置換もしくは非置換のアルキル基、または、置換もしくは非置換のアルカノイル基を表す) で表される化合物、または、一般式 (I I I)

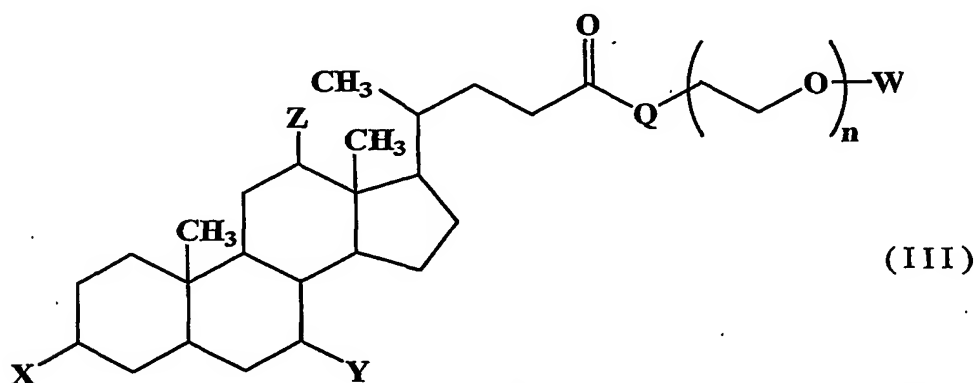


{式中、X、YおよびZは、同一または異なって、水素原子、水酸基またはオキシ (=O) 基を表し、Qは、酸素原子またはNHを表し、Wは、水素原子、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、アルカノイル基、アルケノイル基、アルキノイル基、置換もしくは非置換のアリール基、置換もしくは非置換のアミノアルキル基、または、一般式 (I V)

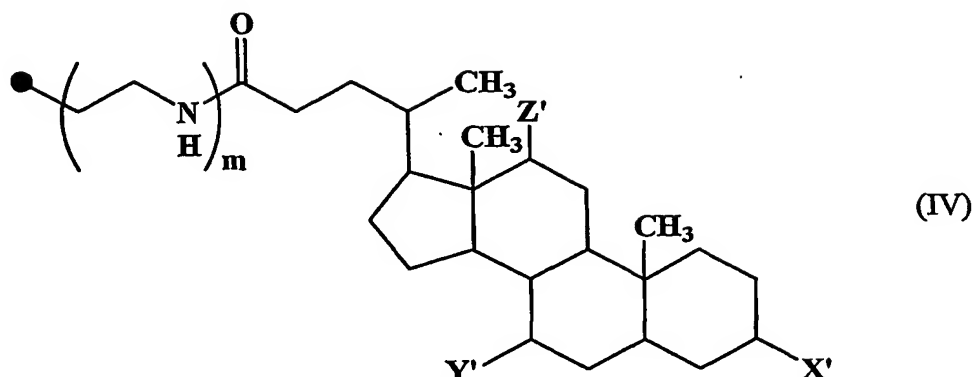


[式中、 $X'$ 、 $Y'$  および  $Z'$  は、同一または異なって、水素原子、水酸基またはオキシ ( $=O$ ) 基を表し、 $m$  は、0 または 1 を表す] で表される基を表し、 $n$  は、3 ~ 400 の整数を表す] で表される化合物である [39] 記載のキット。

[41] 一般式 (III)

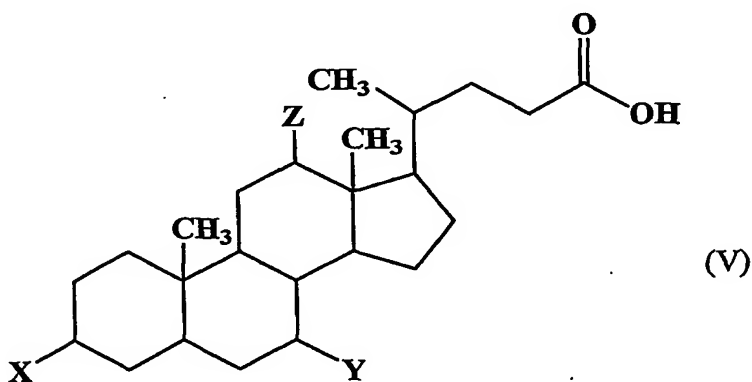


{式中、 $X$ 、 $Y$  および  $Z$  は、同一または異なって、水素原子、水酸基またはオキシ ( $=O$ ) 基を表し、 $Q$  は、酸素原子または  $NH$  を表し、 $W$  は、水素原子、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、アルカノイル基、アルケノイル基、アルキノイル基、置換もしくは非置換のアリール基、置換もしくは非置換のアミノアルキル基、または、一般式 (IV)

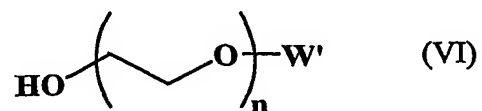


[式中、X'、Y' および Z' は、同一または異なって、水素原子、水酸基またはオキシ (=O) 基を表し、m は、0 または 1 を表す] で表される基を表し、n は、3～400 の整数を表す] で表される化合物。

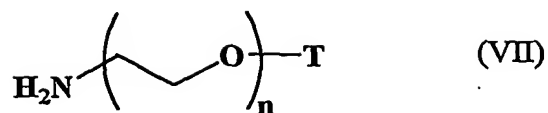
[42] 一般式 (V)



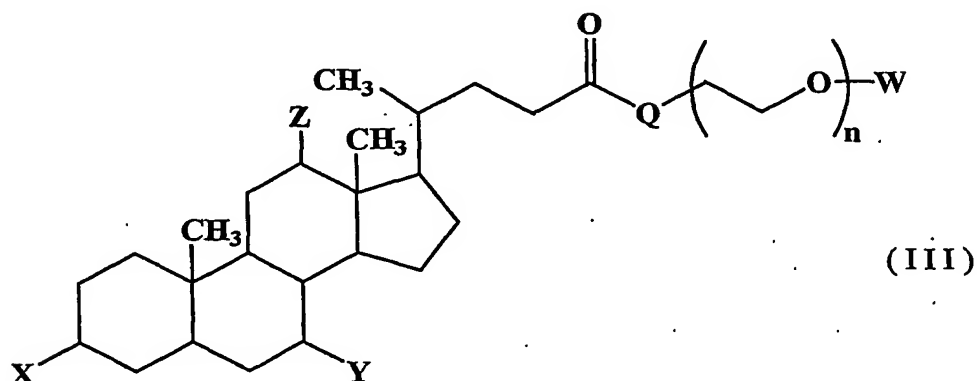
[式中、X、Y および Z は、同一または異なって、水素原子、水酸基またはオキシ (=O) 基を表す] で表される化合物と、一般式 (VI)



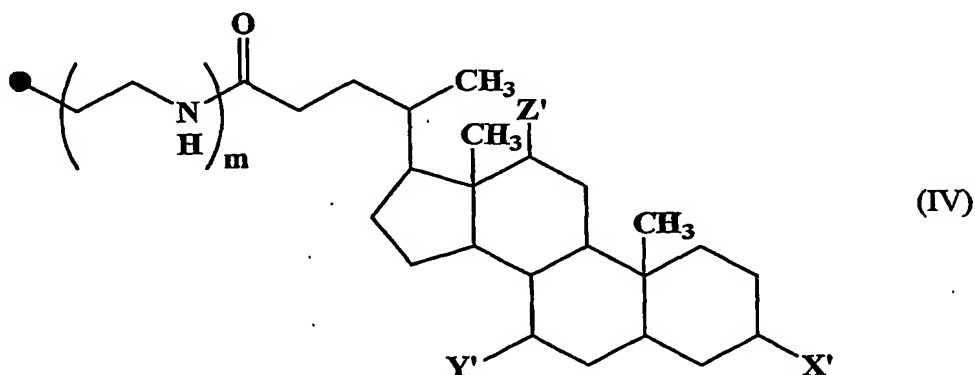
(式中、W' は、水素原子、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、アルカノイル基、アルケノイル基、アルキノイル基、または、置換もしくは非置換のアリール基を表し、n は、3～400 の整数を表す) で表される化合物、または、一般式 (VII)



(式中、Tは、置換もしくは非置換のアミノアルキル基を表し、nは、3～400の整数を表す)で表される化合物とを、縮合剤の存在下に反応させることを特徴とする一般式 (III)



{式中、X、YおよびZは、同一または異なって、水素原子、水酸基またはオキシ(=O)基を表し、Qは、酸素原子またはNHを表し、Wは、水素原子、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、アルカノイル基、アルケノイル基、アルキノイル基、置換もしくは非置換のアリール基、置換もしくは非置換のアミノアルキル基、または、一般式 (IV)}



[式中、X'、Y'およびZ'は、同一または異なって、水素原子、水酸基またはオキシ(=O)基を表し、mは、0または1を表す]で表される基を表し、nは、3～400の整数を表す}で表される化合物の製造方法。

本発明のHDLコレステロールの測定方法は、HDL以外のリポ蛋白中のコレステロールを消去することなく、HDLコレステロールを測定する方法である。

本発明の測定方法において用いられる検体としては、例えば全血、血漿、血清、髄液、唾液、羊水、尿、汗、腓液等があげられるが、血漿および血清が好ましい。

本発明におけるコレステロールエステル加水分解酵素としては、コレステロールエステルを加水分解する能力を有する酵素であれば特に限定はなく、例えば動物、植物または微生物由来のコレステロールエステラーゼ、リポプロテインリパーゼの他、遺伝子工学的な手法により製造されるコレステロールエステラーゼ、リポプロテインリパーゼ等も用いることができる。

コレステロールエステル加水分解酵素としては、無修飾のコレステロールエステル加水分解酵素も、化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素も使用することができる。また、コレステロールエステル加水分解酵素としては市販品を使用することもできる。

市販されているコレステロールエステル加水分解酵素としては、コレステロールエステラーゼ“Amano”2 (CHE 2 ; 天野エンザイム社製)、コレステロールエステラーゼ“Amano”3 (CHE 3 ; 天野エンザイム社製)、リポプロテインリパーゼ (LPL 311 ; 東洋紡製社製)、リポプロテインリパーゼ“Amano”6 (LPL 6 ; 天野エンザイム社製)、コレステロールエステラーゼ [COE 313 (化学的に修飾されたコレステロールエステラーゼ) ; 東洋紡績社製] 等があげられる。また、本発明においては、2種類以上のコレステロールエステル加水分解酵素を組み合わせることもできる。

コレステロールエステル加水分解酵素の化学修飾において当該酵素を修飾する基 (化学修飾基) としては、例えばポリエチレングリコールを主成分とする基、ポリプロピレングリコールを主成分とする基、ポリプロピレングリコールとポリエチレングリコールの共重合体を有する基、水溶性多糖類を

含有する基、スルホプロピル基、スルホブチル基、ポリウレタン基、キレート機能を有する基等があげられるが、ポリエチレングリコールを主成分とする基が好ましい。水溶性多糖類としては、例えばデキストラン、プルラン、可溶性デンプン等があげられる。

コレステロールエステル加水分解酵素を化学的に修飾するための試薬（化学修飾剤）としては、上記の化学修飾基と、酵素のアミノ基、カルボキシル基、スルフヒドリル基等と反応し得る官能基または構造とを併せ持つ化合物等があげられる。酵素中のアミノ基と反応し得る官能基または構造としては、例えばカルボキシル基、活性エステル基（N-ヒドロキシサクシンイミド基等）、酸無水物、酸塩化物、アルデヒド、エポキシド基、1, 3-プロパンスルトン、1, 4-ブタンスルトン等があげられる。酵素中のカルボキシル基と反応し得る官能基または構造としては、例えばアミノ基等があげられる。酵素中のスルフヒドリル基と反応性がある基または構造としては、例えばマレイミド基、ジスルフィド、 $\alpha$ -ハロエステル（ $\alpha$ -ヨードエステル等）等があげられる。

化学修飾剤として、市販品を使用することもできる。市販されている化学修飾剤としては、ポリエチレングリコールを主成分とする基とN-ヒドロキシサクシンイミド基とを有するサンブライトVFM-4101、サンブライトMEAC-50HS、サンブライトMEC-50HS（いずれも日本油脂社製）、ポリアルキレングリコールを主成分とする基と酸無水物構造とを有するサンブライトAKMシリーズ（例えば、サンブライトAKM-1510等）、サンブライトADMシリーズ、サンブライトACMシリーズ（いずれも日本油脂社製）、ポリエチレングリコールを主成分とする基とエポキシド基とを有するEPOX-3400、M-EPOX-5000（いずれもSheawater Polymers社製）、キレート機能を有する基と酸無水物構造とを有するジエチレントリアミン-N, N, N', N', N'-ペンタ無水酢酸（DTPA anhydride；同仁化学社製）等があげられる。

コレステロールエステル加水分解酵素の化学修飾は、例えば以下の方法で行うことができるが、本方法に限定されるものではない。まず、コレステロールエステル加水分解酵素を pH 8.0 以上の緩衝液（例えば HEPES 緩衝液）に溶解し、0～55℃で 0.01～500 倍モル量の化学修飾剤を添加し、5 分間～5 時間攪拌する。実際の酵素反応においては、化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素として、この反応液そのもののみならず、必要に応じて限外濾過膜等により未反応の化学修飾剤等を除去したのも、使用することもできる。

本反応の方法に用いられるコレステロールエステル加水分解酵素の濃度としては、本発明の HDL コレステロールの測定を可能とする濃度であれば特に制限はないが、反応液中で 0.01～200 U/mL の濃度であることが好ましく、0.02～100 U/mL であることがより好ましい。

本発明におけるコレステロール酸化酵素としては、コレステロールを酸化して過酸化水素を生成する能力を有する酵素であれば特に制限はなく、例えば動物、植物または微生物由来のコレステロールオキシダーゼの他、遺伝子工学的な手法により製造されるコレステロールオキシダーゼ等も用いることができ、コレステロールオキシダーゼ “Amano” 1 (CHOD 1; 天野エンザイム社製)、コレステロールオキシダーゼ (CO-PE; キッコーマン社製)、コレステロールオキシダーゼ (COO 3 2 1; 東洋紡績社製) 等の市販品を用いることもできる。また、本発明においては、2 種類以上のコレステロール酸化酵素を組み合わせることもできる。

コレステロール酸化酵素は、無修飾の酵素であっても、化学的に修飾された酵素であってもよい。化学的に修飾されたコレステロール酸化酵素は、例えば前述の化学修飾剤を用いて、前述の化学修飾方法により作製することができる。

本反応の方法に用いられるコレステロール酸化酵素の濃度としては、本発明の HDL コレステロールの測定を可能とする濃度であれば特に制限はないが、反応液中で 0.01～200 U/mL の濃度であることが好ましく、



0.02~100 U/mLの濃度であることがより好ましい。

本発明におけるコレステロール脱水素酵素としては、酸化型補酵素の存在下にコレステロールを酸化して還元型補酵素を生成する能力を有する酵素であれば特に制限はなく、例えば動物、植物または微生物由来のコレステロールデヒドロゲナーゼの他、遺伝子工学的な手法により製造されるコレステロールデヒドロゲナーゼ等も用いることができる。コレステロールデヒドロゲナーゼ“*Amano*” 5 (CHDH5; 天野エンザイム社製)等の市販品を用いることもできる。また、本発明においては、2種類以上のコレステロール脱水素酵素を組み合わせることもできる。コレステロール脱水素酵素は、無修飾の酵素であっても、化学的に修飾された酵素であってもよい。化学的に修飾されたコレステロール脱水素酵素は、例えば前述の化学修飾剤を用いて、前述の化学修飾方法により作製することができる。

本反応の方法に用いられるコレステロール脱水素酵素の濃度としては、本発明のHDLコレステロールの測定を可能とする濃度であれば特に制限はないが、反応液中で0.01~200 U/mLの濃度であることが好ましく、0.02~100 U/mLの濃度であることがより好ましい。

本発明のコレステロール脱水素酵素を用いた測定法においては、酸化型補酵素が使用される。酸化型補酵素としては、例えばNAD、NADP、チオールNAD、チオールNADP等があげられる。

本発明において用いられるアルブミンとしては、本発明のHDLコレステロールの測定を可能とするアルブミンであれば特に限定はなく、例えばウシ、ウマ、ヒツジ、ヒト由来のアルブミン等があげられるが、ウシ血清アルブミン(BSA)が好ましくあげられる。また、遺伝子工学的な手法により製造されるアルブミンも使用することができる。本発明においては、由来の異なる2種類以上のアルブミンを組み合わせることもできる。本発明のHDLコレステロールの測定におけるアルブミンの濃度としては、本発明のHDLコレステロールの測定を可能とする濃度であれば特に制限はないが、反応液中の濃度が0.001~10%であることが好ましく、0.01~1%

がより好ましい。

本発明における胆汁酸誘導体としては、本発明のHDLコレステロールの測定を可能とする胆汁酸誘導体であれば特に制限はないが、例えば陰イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体、両性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体、非イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体等があげられる。

本発明の胆汁酸誘導体としては、非イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体が、コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素およびコレステロールエステル加水分解酵素等のコレステロール測定酵素を用いたHDLコレステロールの測定の正確性もしくは再現性の点、またはコレステロール測定酵素の保存安定性の点等で特に好ましい。

陰イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体としては、例えばコール酸もしくはその塩、タウロコール酸もしくはその塩、グリココール酸もしくはその塩、リトコール酸もしくはその塩、デオキシコール酸もしくはその塩、ケノデオキシコール酸もしくはその塩、ウルソデオキシコール酸もしくはその塩、7-オキシリトコール酸もしくはその塩、12-オキシリトコール酸もしくはその塩、12-オキシケノデオキシコール酸もしくはその塩、7-オキシデオキシコール酸もしくはその塩、ヒオコール酸もしくはその塩、ヒオデオキシコール酸もしくはその塩、デヒドロコール酸もしくはその塩等があげられる。塩としては、例えばアンモニウム塩、リチウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩等があげられる。陰イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体の濃度としては、本発明のHDLコレステロールの測定を可能とする濃度であれば特に制限はないが、反応液中の濃度が0.001～30%であることが好ましく、0.01～3%がより好ましい。

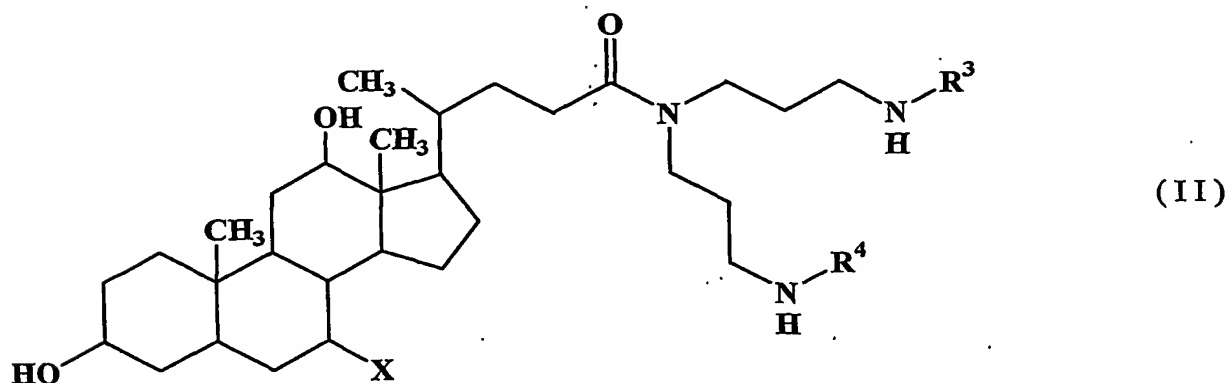
両性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体としては、例えば一般式(I)



〔式中、 $R^1$ は、3-(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ基であり、 $R^2$ は、水素原子または水酸基である〕で表される化合物〔以下、化合

物 (I) という] 等があげられる。以下、 $R^2$  が水素原子である化合物 (I) を CHAPS と、 $R^2$  が水酸基である化合物 (I) を CHAPSO とよぶ。両性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体の濃度としては、本発明の HDL コレステロールの測定を可能とする濃度であれば特に制限はないが、反応液中の濃度が 0.001 ~ 30% であることが好ましく、0.01 ~ 3% がより好ましい。

非イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体としては、例えば一般式 (II)



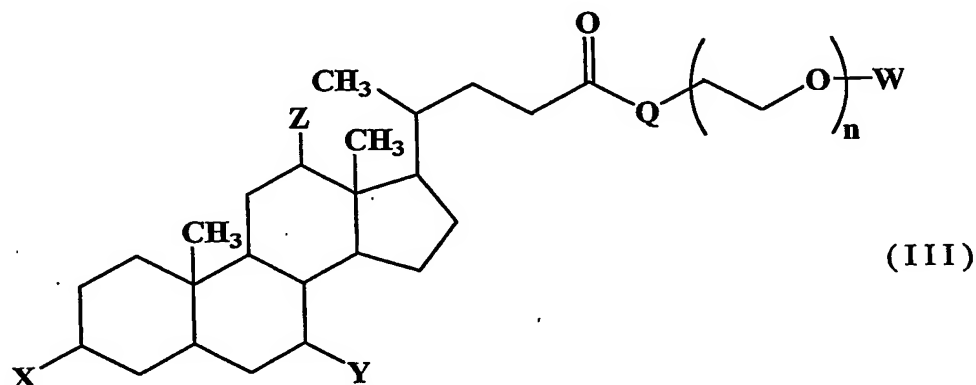
(X は、水素原子または水酸基を表し、 $R^3$  および  $R^4$  は、同一または異なって、置換もしくは非置換のアルキル、または、置換もしくは非置換のアルカノイルを表す) で表される化合物 [以下、化合物 (II) という] 等があげられる。化合物 (II) におけるアルキル基、アルカノイル基に共通のアルキルとしては、直鎖または分枝状の炭素数 1 ~ 10 の、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル等があげられる。化合物 (II) 中の置換アルキル基および置換アルカノイル基における置換基としては、例えば水酸基、ハロゲン原子等があげられる。ハロゲン原子は、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素の各原子を意味する。化合物 (II) のうち、 $R^3$  および  $R^4$  が共に、



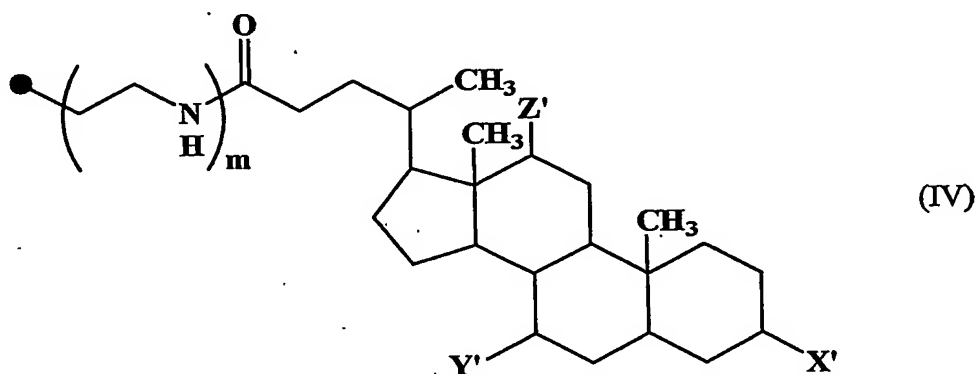
(以下、置換基 A という) である化合物が好ましい。以下、X、 $R^3$  および

$R^4$ がそれぞれ、水素原子、置換基Aおよび置換基Aである化合物を *deoxy-BIGCHAP*、水酸基、置換基Aおよび置換基Aである化合物を *BIGCHAP* という。

また、非イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体としては、例えば一般式 (III)

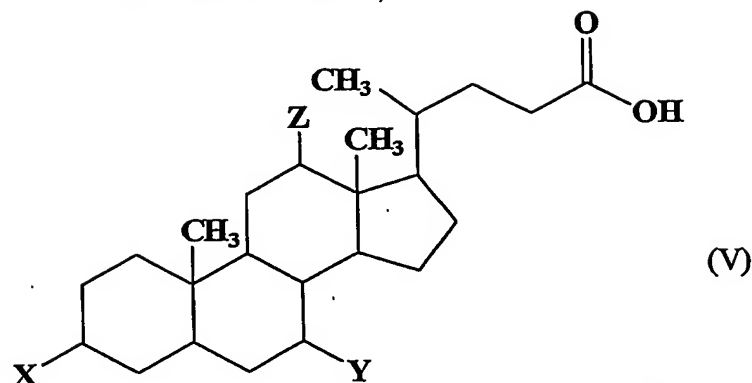


{式中、X、YおよびZは、同一または異なって、水素原子、水酸基またはオキシ(=O)基を表し、Qは、酸素原子またはNHを表し、Wは、水素原子、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、アルカノイル基、アルケノイル基、アルキノイル基、置換もしくは非置換のアリール基、置換もしくは非置換のアミノアルキル基、または、一般式 (IV)}

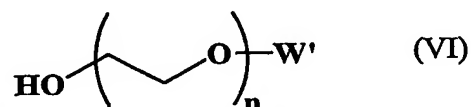


[式中、 $X'$ 、 $Y'$ および $Z'$ は、同一または異なって、水素原子、水酸基またはオキシ(=O)基を表し、 $m$ は、0または1を表す]で表される基[以下、置換基 (IV) という]を表し、 $n$ は、3~400の整数を表す]で表される化合物[以下、化合物 (III) という]もあげることができる。

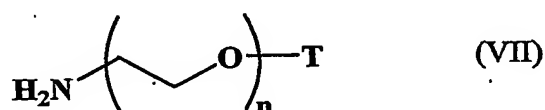
化合物 (I I I) は、例えば一般式 (V)



[式中、X、YおよびZは、同一または異なって、水素原子、水酸基またはオキシ (=O) 基を表す] で表される化合物 [以下、化合物 (V) という] と、一般式 (V I)



(式中、W' は、水素原子、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、アルカノイル基、アルケノイル基、アルキノイル基、または、置換もしくは非置換のアリール基を表し、nは、3～400の整数を表す) で表される化合物 [以下、化合物 (V I) という]、または、一般式 (V I I)



(式中、Tは、置換もしくは非置換のアミノアルキル基を表し、nは、3～400の整数を表す) で表される化合物 [以下、化合物 (V I I) という] とを、縮合剤の存在下、溶媒中で反応させることにより製造 (合成) することができる。本反応においては、必要に応じて塩基を共存させることもできる。

X、YおよびZは水素原子、水酸基またはオキシ基を表すが、X、Y、Zのうち少なくとも1つは水酸基であることが好ましい。X'、Y'およびZ'は水素原子、水酸基またはオキシ基を表すが、X'、Y'、Z'のうち少な

くとも1つは水酸基であることが好ましい。

化合物 (I I I) および化合物 (V I) におけるアルキル基、アルカノイル基に共通のアルキル基としては、直鎖または分岐状の炭素数1~18の、例えばメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基、ペンチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基、ヘキシル基、イソヘキシル基、ヘプチル基、イソヘプチル基、オクチル基、イソオクチル基、ノニル基、イソノニル基、デシル基、イソデシル基、ウンデシル基、イソウンデシル基、ドデシル基、イソドデシル基、トリデシル基、イソトリデシル基、テトラデシル基、イソテトラデシル基、ペンタデシル基、イソペンタデシル基、ヘキサデカシル基、イソヘキサデカシル基、ヘプタデシル基、イソヘプタデシル基、オクタデカシル基、イソオクタデカシル基等があげられ、メチル基、エチル基、プロピル基、ノニル基、ドデシル基等が好ましい。

化合物 (I I I) および化合物 (V I) におけるアルケニル基、アルケノイル基に共通のアルケニル基としては、直鎖または分岐状の炭素数2~8の、例えばビニル基、プロペニル基、イソプロペニル基、アリル基、ブテニル基、ペンテニル基、ヘキセニル基、ヘプテニル基、オクテニル基等があげられる。

化合物 (I I I) および化合物 (V I) におけるアルキニル基、アルキノイル基に共通のアルキニル基としては、直鎖または分岐状の炭素数2~8の、例えばエチニル基、プロピニル基、プロパルギル基、ブチニル基、ペンチニル基、ヘキシニル基、ヘプチニル基、オクチニル基等があげられる。

化合物 (I I I) および化合物 (V I) におけるシクロアルキル基としては、炭素数3~8の、例えばシクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基、シクロヘプチル基、シクロオクチル基等があげられる。

化合物 (I I I) および化合物 (V I) におけるシクロアルケニル基としては、炭素数4~8の、例えばシクロプロペニル基、シクロブテニル基、シクロペンテニル基、シクロヘキセニル基、シクロヘプテニル基、シクロオク

テニル基等があげられる。

化合物 (I I I) および化合物 (V I) におけるアリール基としては、炭素数 6 ~ 15 の、例えばフェニル基、ナフチル基、アントリル基、フェナントリル基、ビフェニル基等があげられる。化合物 (I I I) における置換アリール基の置換基としては、例えばアルキル基等があげられる。該アルキル基としては、例えば前述のアルキル基が挙げられる。

化合物 (I I I) および化合物 (V I I) における置換アミノアルキル基としては、例えば N—置換アミノアルキル基、N, N—二置換アミノアルキル基等が挙げられる。N, N—二置換アミノアルキル基における窒素原子上の 2 つの置換基は同じでも異なってもよい。N—置換アミノアルキル基および N, N—二置換アミノアルキル基における窒素原子上の置換基としては、例えば前述のアルキル基等が挙げられる。N—置換アミノアルキル基としては、例えば 2—(N—メチルアミノ) エチル基、2—(N—エチルアミノ) エチル基、2—(N—プロピルアミノ) エチル基、2—(N—ブチルアミノ) エチル基、3—(N—メチルアミノ) プロピル基、3—(N—エチルアミノ) プロピル基、3—(N—プロピルアミノ) プロピル基、3—(N—ブチルアミノ) プロピル基、4—(N—メチルアミノ) ブチル基、4—(N—エチルアミノ) ブチル基、4—(N—プロピルアミノ) ブチル基、4—(N—ブチルアミノ) ブチル基等を具体的に挙げることができる。N, N—二置換アミノアルキル基としては、例えば 2—(N, N—ジメチルアミノ) エチル基、3—(N, N—ジメチルアミノ) プロピル基、4—(N, N—ジメチルアミノ) ブチル基等を具体的に挙げることができる。化合物 (I I I) および化合物 (V I I) における非置換アミノアルキル基としては、2—アミノエチル基、3—アミノプロピル基、4—アミノブチル基等を具体的に挙げることができる。

n は、エステル部分におけるオキシエチレン基の平均重合度を表す。平均重合度は、本発明の HDL コレステロールの測定を可能とする範囲であれば特に制限はないが、3 ~ 400 が好ましく、8 ~ 300 がより好ましく、1

5～200が特に好ましい。

化合物(V)としては、例えばコール酸、リトコール酸、デオキシコール酸、ケノデオキシコール酸、ウルソデオキシコール酸、7-オキシリトコール酸、12-オキシリトコール酸、12-オキシケノデオキシコール酸、7-オキシデオキシコール酸、ヒオコール酸、ヒオデオキシコール酸、デヒドロコール酸等があげられる。

Wが、水素原子、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、アルカノイル基、アルケノイル基、アルキノイル基、置換もしくは非置換のアリール基および置換もしくは非置換のアミノアルキル基からなる群より選ばれる基である化合物(III)〔以下、化合物(IIIa)という〕を合成する場合には、化合物(VI)または化合物(VII)の化合物(V)に対する当量比は、0.5～1.5が好ましく、1～1.2がより好ましい。Wが、一般式(IV)で表される基である化合物(III)〔以下、化合物(IIIb)という〕を合成する場合には、化合物(V)の化合物(VI)または化合物(VII)に対する当量比は、1.3～4.1が好ましく、1.7～2.2がより好ましい。

化合物(III)を合成する際の反応温度としては、10～40℃が好ましく、20～35℃がより好ましい。化合物(III)を合成する際の反応溶媒としては、化合物(V)と化合物(VI)との縮合反応を妨げないような溶媒であれば特に制限はないが、例えば有機溶媒があげられる。該有機溶媒としては、例えばトルエン、キシレン等の芳香族炭化水素系溶媒、酢酸エチル等の脂肪族エステル系溶媒、ジクロロメタン、クロロホルム、ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素系溶媒等があげられる。

化合物(III)を合成する際に使用する縮合剤としては、化合物(V)と化合物(VI)または化合物(VII)との縮合反応を進行させるものであれば特に制限はないが、例えばカルボジイミド類、ピリジニウム塩、(ベンゾ)チアゾリウム塩、(ベンゾ)オキサゾリウム塩、イソシアナート類、カルボニル試薬等があげられるが、カルボジイミド類が好ましい。カルボジ



イミド類としては、例えば1, 3-ジシクロヘキシルカルボジミド、1, 3-ジ(*tert*-ブチル)カルボジミド、1, 3-ジイソプロピルカルボジミド、水溶性カルボジイミド等があげられるが、水洗浄除去の簡便さから、特に水溶性カルボジミドが好ましい。水溶性カルボジミドとしては、例えば1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジミドまたはその塩等があげられる。該塩としては、例えば塩酸塩、沃化メチル塩等があげられる。ピリジニウム塩としては、例えば2-クロロメチルピリジニウムヨード塩、2-ブルモメチルピリジニウムヨード塩等があげられる。(ベンゾ)オキサゾリウム塩としては、例えば2-クロロベンゾオキサゾリウムフッ化ホウ素塩等があげられる。(ベンゾ)チアゾリウム塩としては、例えば2-クロロベンゾチアゾリウムフッ化ホウ素塩等があげられる。イソシアナート類としては、例えばクロロスルホニルイソシアナート等があげられる。カルボニル試薬としては、例えば1, 1-カルボニルジイミダゾール等があげられる。

縮合反応における縮合剤の当量数としては、化合物(IIIa)を合成する場合には、化合物(V)に対して1.0~5.0当量が好ましく、1.1~2.5当量がより好ましく、化合物(IIIb)を合成する場合には、化合物(VI)または化合物(VII)に対して1.0~5.0当量が好ましく、1.1~2.5当量がより好ましい。

化合物(III)を合成する際に必要に応じて使用する塩基としては、例えばピリジン類縁体があげられる。該ピリジン類縁体としては、例えばピリジン、2-ピコリン、3-ピコリン、4-ピコリン、2-エチルピリジン、3-エチルピリジン、4-エチルピリジン、2-プロピルピリジン、3-プロピルピリジン、4-プロピルピリジン、2, 6-ルチジン、2, 3-ルチジン、2, 4-ルチジン、2, 5-ルチジン、3, 4-ルチジン、3, 5-ルチジン、2, 4, 6-コリジン、2, 3, 5-コリジン、2-ジメチルアミノピリジン、4-ジメチルアミノピリジン、4-ピロリジノピリジン、4-ペペリジノピリジン等があげられ、特に4-ジメチルアミノピリジン、4-

ーピロリジノピリジン、4-ピペリジノピリジンが好ましい。ピリジン類縁体の当量としては、化合物(V)に対して0.01~2.5当量が好ましく、0.7~1.2当量がより好ましい。

化合物(V)と化合物(VI)または化合物(VII)との縮合反応の後処理としては、例えば水または水と有機溶媒との混合溶媒を反応溶液に加え、生成した反応混合物から化合物(III)〔化合物(IIIa)または化合物(IIIb)〕を有機溶媒で抽出し、抽出した溶液に含まれる水を乾燥剤で除去した後、該乾燥剤をろ過し、得られたろ液中の溶媒を常圧下または減圧下で留去する、という一連の操作があげられる。また、化合物(III)を含有する抽出溶液を酸で洗浄し、該抽出溶液中の塩基性物質(縮合剤、縮合剤由来物質、塩基)を除去してもよい。酸で洗浄された抽出溶液は、さらに水または食塩水で洗浄されることが好ましい。反応溶液中加入えられる有機溶媒は、反応に使用される有機溶媒と同じでも異なってもよいが、同じであることが好ましい。また、反応溶液中加入えられる有機溶媒と抽出に使用される有機溶媒とは同じでも異なってもよい。反応溶液中加入えられる有機溶媒や抽出に使用される有機溶媒としては、例えば前述の有機溶媒があげられ、中でもジクロロメタン、酢酸エチル等が好ましい。

化合物(V)と化合物(VI)または化合物(VII)との縮合反応の後処理により得られる化合物(III)を含有する反応混合物は、そのままでもHDLコレステロールの測定に使用できるが、適宜、分離・精製操作により精製されたものも使用することもできる。該分離・精製方法としては、例えばシリカゲルカラムクロマトグラフィー、HPLC、蒸留、分留、再結晶等があげられる。

非イオン性界面活性を有する胆汁酸誘導体の濃度としては、本発明のHDLコレステロールの測定を可能とする濃度であれば特に制限はないが、反応液中の濃度が0.001~30%であることが好ましく、0.01~3%がより好ましい。

本発明のHDLコレステロール測定法において使用される水性媒体とし

ては、例えば脱イオン水、蒸留水、緩衝液等があげられるが、緩衝液が好ましい。緩衝液に用いる緩衝剤としては、例えばトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン緩衝剤、リン酸緩衝剤、ホウ酸緩衝剤、グッドの緩衝剤等があげられる。グッドの緩衝剤としては、例えば2-モルホリノエタンスルホン酸（MES）、ビス（2-ヒドロキシエチル）イミノトリス（ヒドロキシメチル）メタン（Bis-Tris）、N-（2-アセトアミド）イミノ二酢酸（ADA）、ピペラジン-N, N'-ビス（2-エタンスルホン酸）（PIPES）、N-（2-アセトアミド）-2-アミノエタンスルホン酸（ACES）、3-モルホリノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸（MOPSO）、N, N'-ビス（2-ヒドロキシエチル）-2-アミノエタンスルホン酸（BES）、3-モルホリノプロパンスルホン酸（MOPS）、N-〔トリス（ヒドロキシメチル）メチル〕-2-アミノエタンスルホン酸（TES）、2-〔4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジニル〕エタンスルホン酸（HEPES）、3-〔N, N'-ビス（2-ヒドロキシエチル）アミノ〕-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸（DIPSO）、N-〔トリス（ヒドロキシメチル）メチル〕-2-ヒドロキシ-3-アミノプロパンスルホン酸（TAPSO）、ピペラジン-N, N'-ビス（2-ヒドロキシプロパンスルホン酸）（POPSO）、3-〔4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジニル〕-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸（HEPPSO）、3-〔4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジニル〕プロパンスルホン酸〔（H）EPPS〕、N-〔トリス（ヒドロキシメチル）メチル〕グリシン（Tricine）、N, N'-ビス（2-ヒドロキシエチル）グリシン（Bicine）、N-トリス（ヒドロキシメチル）メチル-3-アミノプロパンスルホン酸（TAPS）、N-シクロヘキシル-2-アミノエタンスルホン酸（CHES）、N-シクロヘキシル-3-アミノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸（CAPSO）、N-シクロヘキシル-3-アミノプロパンスルホン酸（CAPS）等があげられる。緩衝液の濃度は測定に適した濃度であれば特に制限はされないが、0.001～2.0 mol/Lが好ましく、

0.005～1.0mol/Lがより好ましい。

以下に、本発明のHDLコレステロールの測定方法、測定用試薬および測定用キットを具体的に説明する。

#### (HDLコレステロールの測定方法)

本発明のHDLコレステロールの測定方法としては、例えば以下の態様の方法があげられる。

##### 測定方法 1

- (1) 検体と、無修飾のコレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素、または、無修飾のコレステロールエステル加水分解酵素、酸化型補酵素およびコレステロール脱水素酵素とを、胆汁酸誘導体を含む水性媒体中で反応させ、
- (2) 生成した過酸化水素または還元型補酵素を測定し、
- (3) (2)で測定した値と、予め作成した検量線とから、検体中のHDLコレステロール濃度を算出することにより、検体中のHDLコレステロールを測定することができる。

##### 測定方法 2

- (1) 検体と、無修飾のコレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素、または、無修飾のコレステロールエステル加水分解酵素、酸化型補酵素およびコレステロール脱水素酵素とを、胆汁酸誘導体およびアルブミンを含む水性媒体中で反応させ、
- (2) 生成した過酸化水素または還元型補酵素を測定し、
- (3) (2)で測定した値と、予め作成した検量線とから、検体中のHDLコレステロール濃度を算出することにより、検体中のHDLコレステロールを測定することができる。

##### 測定方法 3

- (1) 検体と、化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素、または、化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素、酸化型補酵素およびコレステロール脱水素酵素とを、

胆汁酸誘導体を含有する水性媒体中で反応させ、

(2) 生成した過酸化水素または還元型補酵素を測定し、

(3) (2) で測定した値と、予め作成した検量線とから、検体中のHDLコレステロール濃度を算出することにより、検体中のHDLコレステロールを測定することができる。

#### 測定方法 4

(1) 検体と、化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素、または、化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素、酸化型補酵素およびコレステロール脱水素酵素とを、胆汁酸誘導体およびアルブミンを含有する水性媒体中で反応させ、

(2) 生成した過酸化水素または還元型補酵素を測定し、

(3) (2) で測定した値と、予め作成した検量線とから、検体中のHDLコレステロール濃度を算出することにより、検体中のHDLコレステロールを測定することができる。

本測定法においては、(1) の反応は、例えば10～50℃で、好ましくは20～40℃で、1～60分間、好ましくは2～30分間反応を行う。

生成した過酸化水素の量は、例えば過酸化水素測定用試薬により測定することができる。過酸化水素測定用試薬は、生成した過酸化水素を検出可能な物質へ変換するための試薬である。検出可能な物質としては、例えば色素、発光等があげられるが、色素が好ましい。検出可能な物質が色素の場合には、過酸化水素測定用試薬は、酸化発色型色原体およびペルオキシダーゼ等の過酸化活性物質を含有する。酸化発色型色原体としては、例えば後述の酸化発色型色原体があげられる。検出可能な物質が発光の場合には、過酸化水素測定用試薬は、化学発光物質を含有する。化学発光物質としては、例えばルミノール、イソルミノール、ルシゲニン、アクリジニウムエステル等があげられる。

過酸化水素測定用試薬として、酸化発色型色原体およびペルオキシダーゼ等の過酸化活性物質を含有する試薬を用いる場合には、過酸化水素は、過酸

化活性物質の存在下に酸化発色型色原体と反応して色素を生成し、生成した色素を定量することにより、過酸化水素を定量することができる。また、化学発光物質を含有する過酸化水素測定用試薬を用いる場合には、過酸化水素は、化学発光物質と反応してフォトンを生じ、生じたフォトンを定量することにより、過酸化水素を定量することができる。

酸化発色型色原体としては、例えばロイコ型色原体、酸化カップリング発色型色原体等があげられる。ロイコ型色原体は、過酸化水素およびペルオキシダーゼ等の過酸化活性物質の存在下、単独で色素へ変換される物質である。具体的には、10-N-カルボキシメチルカルバモイル-3,7-ビス(ジメチルアミノ)-10H-フェノチアジン(CCAP)、10-N-メチルカルバモイル-3,7-ビス(ジメチルアミノ)-10H-フェノチアジン(MCDP)、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミンナトリウム塩(DA-64)、4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミン、ビス[3-ビス(4-クロロフェニル)メチル-4-ジメチルアミノフェニル]アミン(BCMA)等があげられる。

酸化カップリング発色型色原体は、過酸化水素およびペルオキシダーゼ等の過酸化活性物質の存在下、2つの化合物が酸化的カップリングして色素を生成する物質である。2つの化合物の組み合わせとしては、カプラーとアニリン類との組み合わせ、カプラーとフェノール類との組み合わせ等があげられる。カプラーとしては、例えば4-アミノアンチピリン(4-AA)、3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラジン等があげられる。アニリン類としては、N-(3-スルホプロピル)アニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メチルアニリン(TOOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルアニリン(MAOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン(DAOS)、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3-メチルアニリン(TOPS)、N-(2-ヒ

ドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン (HDAOS)、N, N-ジメチル-3-メチルアニリン、N, N-ジ(3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)アニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン、N-(3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3, 5-ジメチルアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)アニリン、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン (EMSE)、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-アセチルエチレンジアミン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-4-フルオロ-3, 5-ジメトキシアニリン (F-DAOS) 等があげられる。フェノール類としては、フェノール、4-クロロフェノール、3-メチルフェノール、3-ヒドロキシ-2, 4, 6-トリヨード安息香酸 (HTIB) 等があげられる。

過酸化水素の測定において、過酸化活性物質の濃度は、測定に適した濃度であれば特に制限はないが、過酸化活性物質としてパーオキシダーゼを用いる場合は、1~100 kU/L が好ましい。また、酸化発色型色原体の濃度は、測定に適した濃度であれば特に制限はないが、0.01~10 g/L が好ましい。

還元型補酵素の測定方法としては、例えば生成した還元型補酵素の吸光度を測定する方法、還元型補酵素測定用試薬を用いる方法等があげられる。還元型補酵素の吸光度を測定する方法における吸光度としては、300~500 nm が好ましく、330~400 nm がより好ましく、340 nm 付近が特に好ましい。還元型補酵素測定用試薬は、生成した還元型補酵素を検出可能な物質へ変換するための試薬である。検出可能な物質としては、例えば色素等があげられる。検出可能な物質が色素の

場合の還元型補酵素測定用試薬としては、例えばジアホラーゼ、電子キャリアーおよび還元発色型色原体を含有する試薬があげられる。電子キャリアーとしては、例えば1-メトキシ-5-メチルフェナジウムメチルサルフェート等があげられる。還元型補酵素測定用試薬として、ジアホラーゼ、電子キャリアーおよび還元発色型色原体を含有する試薬を用いる場合には、還元発色型色原体が変換されて生成した色素を定量することにより、還元型補酵素を定量することができる。

還元発色型色原体としては、例えば3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウム ブロミド(MTT)、2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム モノナトリウム塩(WST-1)、2-(4-ヨードフェニル)-3-(2,4-ジニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム モノナトリウム塩(WST-3)等があげられる。

#### (HDL コレステロール測定用試薬)

本発明のHDL コレステロール測定用試薬としては、例えば以下の態様の試薬があげられる。

##### 試薬 1

無修飾のコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、胆汁酸誘導体および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

##### 試薬 2

無修飾のコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、胆汁酸誘導体、アルブミンおよび過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

##### 試薬 3

無修飾のコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、胆汁酸誘導体および酸化型補酵素を含有する試薬。

##### 試薬 4

無修飾のコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵



素、胆汁酸誘導体、アルブミンおよび酸化型補酵素を含有する試薬。

#### 試薬 5

無修飾のコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、胆汁酸誘導体、酸化型補酵素および還元型補酵素測定用試薬を含有する試薬。

#### 試薬 6

無修飾のコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、胆汁酸誘導体、アルブミン、酸化型補酵素および還元型補酵素測定用試薬を含有する試薬。

#### 試薬 7

化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、胆汁酸誘導体および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

#### 試薬 8

化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、胆汁酸誘導体、アルブミンおよび過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

#### 試薬 9

化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、胆汁酸誘導体および酸化型補酵素を含有する試薬。

#### 試薬 10

化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、胆汁酸誘導体、アルブミンおよび酸化型補酵素を含有する試薬。

#### 試薬 11

化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、胆汁酸誘導体、酸化型補酵素および還元型補酵素測定用試薬を含有する試薬。

#### 試薬 12

化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、胆汁酸誘導体、アルブミン、酸化型補酵素および還元型補酵素測定用試薬を含有する試薬。

本発明のHDLコレステロール測定用試薬においては、前述の本発明のHDLコレステロールの測定方法においてあげられたコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、コレステロール脱水素酵素、胆汁酸誘導体、アルブミン、過酸化水素測定用試薬、酸化型補酵素、還元型補酵素測定用試薬を用いることができる。

#### (HDLコレステロール測定用キット)

本発明のHDLコレステロール測定用試薬は、キットの形態で保存、流通および使用されてもよい。キットの形態としては、特に制限はなく、2試薬系、3試薬系等のいずれであってもよいが、2試薬系が好ましい。

第一試薬と第二試薬とからなる2試薬系のHDLコレステロール測定用キットにおいては、コレステロールエステル加水分解酵素と、コレステロール酸化酵素またはコレステロール脱水素酵素とは、第一試薬と第二試薬に別々に含有されても、第二試薬と一緒に含有されてもよいが、第一試薬と第二試薬に別々に含有される場合には、コレステロールエステル加水分解酵素が第一試薬に、コレステロール酸化酵素またはコレステロール脱水素酵素が第二試薬に含有される態様が好ましい。胆汁酸誘導体は、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有されてもよい。コレステロール脱水素酵素を用いた測定法において使用される酸化型補酵素は、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有されてもよい。過酸化水素測定用試薬は、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有されてもよいが、当該試薬が酸化カップリング型色原体を含有する場合には、酸化カップリング型色原体のそれぞれの化合物は別々の試薬に含有される態様が好ましい。還元型補酵素測定用試薬は、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有されてもよい。また、アルブミンは、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有されてもよい。

具体的には、例えば以下の態様のキットがあげられる。

#### キット 1

##### 第一試薬

無修飾のコレステロールエステル加水分解酵素、胆汁酸誘導体および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

##### 第二試薬

コレステロール酸化酵素および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

#### キット 2

##### 第一試薬

無修飾のコレステロールエステル加水分解酵素、胆汁酸誘導体、アルブミンおよび過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

##### 第二試薬

コレステロール酸化酵素および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

#### キット 3

##### 第一試薬

化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素、胆汁酸誘導体および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

##### 第二試薬

コレステロール酸化酵素および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

#### キット 4

##### 第一試薬

化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素、胆汁酸誘導体、アルブミンおよび過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

##### 第二試薬

コレステロール酸化酵素および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

#### キット 5

##### 第一試薬

過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

## 第二試薬

無修飾のコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、胆汁酸誘導体および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

### キット 6

#### 第一試薬

アルブミンおよび過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

#### 第二試薬

無修飾のコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、胆汁酸誘導体および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

### キット 7

#### 第一試薬

過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

#### 第二試薬

化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、胆汁酸誘導体および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

### キット 8

#### 第一試薬

アルブミンおよび過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

#### 第二試薬

化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、胆汁酸誘導体および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

### キット 9

#### 第一試薬

無修飾のコレステロールエステル加水分解酵素および胆汁酸誘導体を含有する試薬。

#### 第二試薬

コレステロール脱水素酵素および酸化型補酵素を含有する試薬。

### キット 10

**第一試薬**

無修飾のコレステロールエステル加水分解酵素、胆汁酸誘導体およびアルブミンを含有する試薬。

**第二試薬**

コレステロール脱水素酵素および酸化型補酵素を含有する試薬。

キット 1 1**第一試薬**

無修飾のコレステロールエステル加水分解酵素および胆汁酸誘導体を含有する試薬。

**第二試薬**

コレステロール脱水素酵素、酸化型補酵素および還元型補酵素測定用試薬を含有する試薬。

キット 1 2**第一試薬**

無修飾のコレステロールエステル加水分解酵素、胆汁酸誘導体およびアルブミンを含有する試薬。

**第二試薬**

コレステロール脱水素酵素、酸化型補酵素および還元型補酵素測定用試薬を含有する試薬。

キット 1 3**第一試薬**

化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素および胆汁酸誘導体を含有する試薬。

**第二試薬**

コレステロール脱水素酵素および酸化型補酵素を含有する試薬。

キット 1 4**第一試薬**

化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素、胆汁酸誘導体

およびアルブミンを含有する試薬。

#### 第二試薬

コレステロール脱水素酵素および酸化型補酵素を含有する試薬。

#### キット 1 5

##### 第一試薬

化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素および胆汁酸誘導体を含有する試薬。

##### 第二試薬

コレステロール脱水素酵素、酸化型補酵素および還元型補酵素測定用試薬を含有する試薬。

#### キット 1 6

##### 第一試薬

化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素、胆汁酸誘導体およびアルブミンを含有する試薬。

##### 第二試薬

コレステロール脱水素酵素、酸化型補酵素および還元型補酵素測定用試薬を含有する試薬。

#### キット 1 7

##### 第一試薬

胆汁酸誘導体を含有する試薬。

##### 第二試薬

無修飾のコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素および酸化型補酵素を含有する試薬。

#### キット 1 8

##### 第一試薬

胆汁酸誘導体およびアルブミンを含有する試薬。

##### 第二試薬

無修飾のコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵

素および酸化型補酵素を含有する試薬。

#### キット 19

##### 第一試薬

胆汁酸誘導体を含有する試薬。

##### 第二試薬

無修飾のコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、酸化型補酵素および還元型補酵素測定用試薬を含有する試薬。

#### キット 20

##### 第一試薬

胆汁酸誘導体およびアルブミンを含有する試薬。

##### 第二試薬

無修飾のコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、酸化型補酵素および還元型補酵素測定用試薬を含有する試薬。

#### キット 21

##### 第一試薬

胆汁酸誘導体を含有する試薬。

##### 第二試薬

化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素および酸化型補酵素を含有する試薬。

#### キット 22

##### 第一試薬

胆汁酸誘導体およびアルブミンを含有する試薬。

##### 第二試薬

化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素および酸化型補酵素を含有する試薬。

#### キット 23

##### 第一試薬

胆汁酸誘導体を含有する試薬。

## 第二試薬

化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、酸化型補酵素および還元型補酵素測定用試薬を含有する試薬。

### キット 24

## 第一試薬

胆汁酸誘導体およびアルブミンを含有する試薬。

## 第二試薬

化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、酸化型補酵素および還元型補酵素測定用試薬を含有する試薬。

本発明のHDLコレステロール測定用キットにおいては、前述の本発明のHDLコレステロールの測定方法においてあげられたコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、コレステロール脱水素酵素、胆汁酸誘導体、アルブミン、過酸化水素測定用試薬、酸化型補酵素、還元型補酵素測定用試薬を用いることができる。

本発明のHDLコレステロール測定用試薬および測定用キットには、必要に応じて、水性媒体、安定化剤、防腐剤、影響物質消去剤、反応促進剤等が含有されてもよい。水性媒体としては、例えば前述の水性媒体等があげられる。安定化剤としては、例えばエチレンジアミン四酢酸（EDTA）、シュエークロース、塩化カルシウム等があげられる。防腐剤としては、例えばアジ化ナトリウム、抗生物質等があげられる。影響物質消去剤としては、例えばアスコルビン酸の影響を消去するためのアスコルビン酸オキシダーゼ等があげられる。反応促進剤としては、例えばコリパーゼ、ホスホリパーゼ等の酵素、硫酸ナトリウム、塩化ナトリウム等の塩類といったものがあげられる。本発明のHDLコレステロール測定用試薬および測定用キットは、凍結乾燥された状態でも、水性媒体に溶解された状態でもよい。凍結乾燥された状態の試薬を用いて検体中のHDLコレステロールを測定する場合には、当該試薬は水性媒体に溶解して使用される。

本発明のHDLコレステロール測定用試薬および測定用キットにおける



コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、コレステロール脱水素酵素の含量としては、水性媒体で溶解された状態での濃度が0.01~800 U/mLとなる含量が好ましく、0.02~400 U/mLとなる含量がより好ましい。本発明のHDLコレステロール測定用試薬および測定用キットにおける胆汁酸誘導体の含量としては、水性媒体で溶解された状態での濃度が0.001~30%となる含量が好ましく、0.01~10%となる含量がより好ましい。本発明のHDLコレステロール測定用試薬および測定用キットにおけるアルブミンの含量としては、水性媒体で溶解された状態での濃度が0.001~10%となる含量が好ましく、0.01~5%となる含量がより好ましい。

以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を何ら限定するものではない。尚、本実施例においては、下記の試薬および酵素を使用した。

HEPES (BDH Laboratory社製)、EMSE (ダイトーケミックス社製)、ウシ血清アルブミン (BSA; オリエンタル社製)、4-アミノアンチピリン (埼京化成社製)、ペルオキシダーゼ (東洋紡績社製)、LPL311 (コレステロールエステル加水分解酵素; 東洋紡績社製)、LPL6 (コレステロールエステル加水分解酵素; 天野エンザイム社製)、CHE2 (コレステロールエステル加水分解酵素; 天野エンザイム社製)、COE313 (化学修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素; 東洋紡績社製)、COO321 (コレステロールオキシダーゼ; 東洋紡績社製)、コール酸ナトリウム (ACROS社製)、タウロコール酸ナトリウム (東京化成社製)、BIGCHAP (同仁化学社製)、CHAPS (同仁化学社製)、デキストラン硫酸ナトリウム (分子量50万; ファルマシア社製)。

また、本実施例において、胆汁酸誘導体の同定に際して、下記の分析機器を用いて各種データを取得した。

核磁気共鳴スペクトル ( $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR): JEOL GSX-400 (日本電子社製)

$^1\text{H}$ -NMR スペクトル測定においては、テトラメチルシランを内部標準として用い、テトラメチルシランを基準とした化学シフト ( $\delta$ ) を表す。 $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル測定においては、 $\text{CDCl}_3$  由来の 3 本のピークの中心のピークを 77.0 ppm とした時の各ピークの化学シフト ( $\delta$ ) を表す。

赤外吸収スペクトル (IR) : Nicolet NEXUS 470 (ニコレー社製)

ゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC) :

システム : TOSOH HLC-8120GPC (東ソー社製)

GPC カラム : TSK gel Super H-RC (低分子分析用)  
(東ソー社製) 2 本を直列接続した。

カラム保持温度 : 40°C

展開溶媒 : テトラヒドロフラン

流速 : 0.5 mL/分

検出器 : RI (屈折率)

検量線作成用標準物質 : ポリエチレングリコール

#### 発明を実施するための最良の形態

参考例 1 化学修飾 LPL311 (化学的に修飾された LPL311) の調製

HEPES 緩衝液 (pH 8.5, 0.15 mol/L) に、LPL311 を 33 g/L となるように加え 5°C に冷却した後、サンブライト VFM-4101 またはサンブライト AKM-1510 またはサンブライト MEAC-50HS (いずれも日本油脂社製) を 330 g/L となるように加え、さらに 3 時間反応させた。得られた修飾酵素溶液を精製分離せずそのまま化学修飾 LPL311 として使用した。

参考例 2 化学修飾 CHE2 (化学的に修飾された CHE2) の調製

HEPES 緩衝液 (pH 8.5, 0.15 mol/L) に、CHE2 を 50 g/L となるように加え 5°C に冷却した後、サンブライト VFM-4101 (日本油脂社製) を 200 g/L となるように加え、さらに 3 時間

反応させた。得られた修飾酵素溶液を精製分離せずそのまま化学修飾CHE 2として使用した。

#### 実施例1 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

##### ・第一試薬

HEPES (pH 7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L

##### ・第二試薬

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL311 (VFM-4101で修飾したもの)	0.2 kU/L
COO321	3.0 kU/L
コール酸ナトリウム	6.0 g/L

#### 実施例2 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

##### ・第一試薬

HEPES (pH 7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
BSA	2.0 g/L

##### ・第二試薬

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL311 (VFM-4101で修飾したもの)	

COO321

コール酸ナトリウム

0.2 kU/L

3.0 kU/L

6.0 g/L

## 実施例3 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

## ・第一試薬

HEPES (pH7.5)

10 mmol/L

EMSE

0.3 g/L

## ・第二試薬

HEPES (pH7.0)

10 mmol/L

4-アミノアンチピリン

0.3 g/L

ペルオキシダーゼ

20 kU/L

化学修飾LPL311 (VFM-4101で修飾したもの)

0.2 kU/L

COO321

3.0 kU/L

タウロコール酸ナトリウム

7.0 g/L

## 実施例4 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

## ・第一試薬

HEPES (pH7.5)

10 mmol/L

EMSE

0.3 g/L

BSA

2.0 g/L

## ・第二試薬

HEPES (pH7.0)

10 mmol/L

4-アミノアンチピリン

0.3 g/L

ペルオキシダーゼ

20 kU/L

化学修飾 L P L 3 1 1 (VFM-4101 で修飾したもの)

0.2 kU/L

COO321

3.0 kU/L

タウロコール酸ナトリウム

7.0 g/L

#### 実施例5 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

##### ・第一試薬

HEPES (pH7.5)

10 mmol/L

EMSE

0.3 g/L

##### ・第二試薬

HEPES (pH7.0)

10 mmol/L

4-アミノアンチピリン

0.3 g/L

ペルオキシダーゼ

20 kU/L

化学修飾 L P L 3 1 1 (VFM-4101 で修飾したもの)

0.2 kU/L

COO321

3.0 kU/L

BIGCHAP

4.5 g/L

#### 実施例6 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

##### ・第一試薬

HEPES (pH7.5)

10 mmol/L

EMSE

0.3 g/L

BSA

2.0 g/L

##### ・第二試薬

HEPES (pH7.0)

10 mmol/L

4-アミノアンチピリン

0.3 g/L

ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL311 (VFM-4101で修飾したもの)	
	0.2 kU/L
COO321	3.0 kU/L
BIGCHAP	4.5 g/L

#### 実施例7 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

##### ・第一試薬

HEPES (pH7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L

##### ・第二試薬

HEPES (pH7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL311 (VFM-4101で修飾したもの)	
	0.2 kU/L
COO321	3.0 kU/L
CHAPS	6.0 g/L

#### 実施例8 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

##### ・第一試薬

HEPES (pH7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
BSA	2.0 g/L

##### ・第二試薬

HEPES (pH7.0)	10 mmol/L
---------------	-----------

4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL311 (VFM-4101で修飾したもの)	
	0.2 kU/L
COO321	3.0 kU/L
CHAPS	6.0 g/L

#### 比較例1 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

##### ・第一試薬

HEPES (pH7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L

##### ・第二試薬

HEPES (pH7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL311 (VFM-4101で修飾したもの)	
	0.2 kU/L
COO321	3.0 kU/L

#### 比較例2 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

##### ・第一試薬

HEPES (pH7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
BSA	2.0 g/L

##### ・第二試薬

HEPES (pH7.0)	10 mmol/L
---------------	-----------

4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL311 (VFM-4101で修飾したもの)	0.2 kU/L
COO321	3.0 kU/L

#### 実施例9 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

##### ・第一試薬

HEPES (pH 7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
BSA	2.0 g/L

##### ・第二試薬

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
LPL6	0.05 kU/L
COO321	3.0 kU/L
コール酸ナトリウム	6.0 g/L

#### 実施例10 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

##### ・第一試薬

HEPES (pH 7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L

##### ・第二試薬

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L



ペルオキシダーゼ	20 kU/L
LPL6	0.05 kU/L
COO321	3.0 kU/L
コール酸ナトリウム	6.0 g/L

#### 実施例11 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

##### ・第一試薬

HEPES (pH7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
BSA	2.0 g/L

##### ・第二試薬

HEPES (pH7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
LPL6	0.05 kU/L
COO321	3.0 kU/L
タウロコール酸ナトリウム	7.0 g/L

#### 実施例12 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

##### ・第一試薬

HEPES (pH7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L

##### ・第二試薬

HEPES (pH7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L

L P L 6	0. 0 5 k U / L
C O O 3 2 1	3. 0 k U / L
タウロコール酸ナトリウム	7. 0 g / L

### 実施例 1 3 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

#### ・第一試薬

HEPES (pH 7. 5)	1 0 m m o l / L
EMSE	0. 3 g / L

#### ・第二試薬

HEPES (pH 7. 0)	1 0 m m o l / L
4-アミノアンチピリン	0. 3 g / L
ペルオキシダーゼ	2. 0 k U / L
L P L 6	0. 0 5 k U / L
C O O 3 2 1	3. 0 k U / L
B I G C H A P	4. 5 g / L

### 実施例 1 4 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

#### ・第一試薬

HEPES (pH 7. 5)	1 0 m m o l / L
EMSE	0. 3 g / L
BSA	2. 0 g / L

#### ・第二試薬

HEPES (pH 7. 0)	1 0 m m o l / L
4-アミノアンチピリン	0. 3 g / L
ペルオキシダーゼ	2 0 k U / L
L P L 6	0. 0 5 k U / L

COO321

3.0 kU/L

BIGCHAP

4.5 g/L

## 実施例15 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

## ・第一試薬

HEPES (pH7.5)

10 mmol/L

EMSE

0.3 g/L

## ・第二試薬

HEPES (pH7.0)

10 mmol/L

4-アミノアンチピリン

0.3 g/L

ペルオキシダーゼ

2.0 kU/L

LPL6

0.05 kU/L

COO321

3.0 kU/L

CHAPS

6.0 g/L

## 実施例16 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

## ・第一試薬

HEPES (pH7.5)

10 mmol/L

EMSE

0.3 g/L

BSA

2.0 g/L

## ・第二試薬

HEPES (pH7.0)

10 mmol/L

4-アミノアンチピリン

0.3 g/L

ペルオキシダーゼ

2.0 kU/L

LPL6

0.05 kU/L

COO321

3.0 kU/L

CHAPS

6.0 g/L

## 比較例3 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

## ・第一試薬

HEPES (pH 7.5)

10 mmol/L

EMSE

0.3 g/L

## ・第二試薬

HEPES (pH 7.0)

10 mmol/L

4-アミノアンチピリン

0.3 g/L

ペルオキシダーゼ

20 kU/L

LPL6

0.05 kU/L

COO321

3.0 kU/L

## 比較例4 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

## ・第一試薬

HEPES (pH 7.5)

10 mmol/L

EMSE

0.3 g/L

BSA

2.0 g/L

## ・第二試薬

HEPES (pH 7.0)

10 mmol/L

4-アミノアンチピリン

0.3 g/L

ペルオキシダーゼ

20 kU/L

LPL6

0.05 kU/L

COO321

3.0 kU/L

## 実施例17 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キ

ットを調製した。

・ 第一試薬

HEPES (pH 7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L

・ 第二試薬

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	2.0 kU/L
化学修飾CHE 2 (VFM-4101で修飾したもの)	0.2 kU/L
COO321	3.0 kU/L
コール酸ナトリウム	6.0 g/L

実施例 18 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

・ 第一試薬

HEPES (pH 7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L

・ 第二試薬

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	2.0 kU/L
化学修飾LPL 311 (MEAC-50HSで修飾したもの)	0.2 kU/L
COO321	3.0 kU/L
コール酸ナトリウム	6.0 g/L

実施例 19 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キ

ットを調製した。

・ 第一試薬

HEPES (pH 7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L

・ 第二試薬

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾 LPL 311 (AKM-1510で修飾したもの)	0.2 kU/L
COO321	3.0 kU/L
コール酸ナトリウム	6.0 g/L

実施例 20 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなる HDL コレステロール測定用キットを調製した。

・ 第一試薬

HEPES (pH 7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L

・ 第二試薬

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
COE313	1.0 kU/L
COO321	3.0 kU/L
コール酸ナトリウム	6.0 g/L

実施例 21 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットを用いて、日立 7170 型自動分析装置によりヒト血清 30 検体中の HDL コレステロールを測定した。

### (1) 検量線の作成

標準液として、生理食塩水（HDLコレステロール濃度：0.0mg/dL）および血清（HDLコレステロール濃度：60.0mg/dL）を、キットとして実施例1のキットを用いて、日立7170型自動分析装置により、HDLコレステロール濃度と「吸光度」との間の関係を示す検量線を作成した。

ここでの「吸光度」とは、以下の反応で測定された2つの吸光度（E1およびE2）を基に、E2からE1を差し引くことにより得られた値を表す。

反応セルへ標準液（3μL）と第一試薬（0.24mL）とを添加し37℃で5分間加温し、反応液の吸光度（E1）を主波長600nm、副波長700nmで測定し、次いで、この反応液に第二試薬（0.08mL）を添加しさらに37℃で5分間加温し、反応液の吸光度（E2）を主波長600nm、副波長700nmで測定した。

### (2) ヒト血清検体と実施例1のキットとの反応による当該検体における「吸光度」の算出

(1)の検量線の作成において用いた標準液の代わりにヒト血清検体を用いる以外は、(1)の「吸光度」の算出方法と同様の方法により、当該検体における「吸光度」を算出した。

### (3) ヒト血清検体中のHDLコレステロール濃度の測定

(2)で算出した「吸光度」と、(1)で作成した検量線とから、各検体中のHDLコレステロール濃度を測定した。

#### 実施例22 HDLコレステロールの測定

実施例1のキットの代わりに実施例2のキットを用いる以外は実施例21の測定法と同様にして、日立7170型自動分析装置によりヒト血清30検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 実施例23 HDLコレステロールの測定

実施例1のキットの代わりに実施例3のキットを用いる以外は実施例21の測定法と同様にして、日立7170型自動分析装置によりヒト血清30

検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 実施例 2 4 HDLコレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 4 のキットを用いる以外は実施例 2 1 の測定法と同様にして、日立 7 1 7 0 型自動分析装置によりヒト血清 3 0 検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 実施例 2 5 HDLコレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 5 のキットを用いる以外は実施例 2 1 の測定法と同様にして、日立 7 1 7 0 型自動分析装置によりヒト血清 3 0 検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 実施例 2 6 HDLコレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 6 のキットを用いる以外は実施例 2 1 の測定法と同様にして、日立 7 1 7 0 型自動分析装置によりヒト血清 3 0 検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 実施例 2 7 HDLコレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 7 のキットを用いる以外は実施例 2 1 の測定法と同様にして、日立 7 1 7 0 型自動分析装置によりヒト血清 3 0 検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 実施例 2 8 HDLコレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 8 のキットを用いる以外は実施例 2 1 の測定法と同様にして、日立 7 1 7 0 型自動分析装置によりヒト血清 3 0 検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 比較例 5 HDLコレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに比較例 1 のキットを用いる以外は実施例 2 1 の測定法と同様にして、日立 7 1 7 0 型自動分析装置によりヒト血清 3 0 検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 比較例 6 HDLコレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに比較例 2 のキットを用いる以外は実施例 2 1 の測定法と同様にして、日立 7 1 7 0 型自動分析装置によりヒト血清 3 0



検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 実施例 29 HDLコレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 9 のキットを用いる以外は実施例 21 の測定法と同様にして、日立 7170 型自動分析装置によりヒト血清 30 検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 実施例 30 HDLコレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 10 のキットを用いる以外は実施例 21 の測定法と同様にして、日立 7170 型自動分析装置によりヒト血清 30 検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 実施例 31 HDLコレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 11 のキットを用いる以外は実施例 21 の測定法と同様にして、日立 7170 型自動分析装置によりヒト血清 30 検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 実施例 32 HDLコレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 12 のキットを用いる以外は実施例 21 の測定法と同様にして、日立 7170 型自動分析装置によりヒト血清 30 検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 実施例 33 HDLコレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 13 のキットを用いる以外は実施例 21 の測定法と同様にして、日立 7170 型自動分析装置によりヒト血清 30 検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 実施例 34 HDLコレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 14 のキットを用いる以外は実施例 21 の測定法と同様にして、日立 7170 型自動分析装置によりヒト血清 30 検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 実施例 35 HDLコレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 15 のキットを用いる以外は実施例 21 の測定法と同様にして、日立 7170 型自動分析装置によりヒト血清 30 検体中のHDLコレステロールを測定した。

0 検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 実施例 36 HDLコレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 16 のキットを用いる以外は実施例 21 の測定法と同様にして、日立 7170 型自動分析装置によりヒト血清 30 検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 比較例 7 HDLコレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに比較例 3 のキットを用いる以外は実施例 21 の測定法と同様にして、日立 7170 型自動分析装置によりヒト血清 30 検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 比較例 8 HDLコレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに比較例 4 のキットを用いる以外は実施例 21 の測定法と同様にして、日立 7170 型自動分析装置によりヒト血清 30 検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 実施例 37 HDLコレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 17 のキットを用いる以外は実施例 21 の測定法と同様にして、日立 7170 型自動分析装置によりヒト血清 30 検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 実施例 38 HDLコレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 18 のキットを用いる以外は実施例 21 の測定法と同様にして、日立 7170 型自動分析装置によりヒト血清 30 検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 実施例 39 HDLコレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 19 のキットを用いる以外は実施例 21 の測定法と同様にして、日立 7170 型自動分析装置によりヒト血清 30 検体中のHDLコレステロールを測定した。

#### 実施例 40 HDLコレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 20 のキットを用いる以外は実施例 21 の測定法と同様にして、日立 7170 型自動分析装置によりヒト血清 30

0 検体中のHDLコレステロールを測定した。

一方、実施例 21～40 および比較例 5～8 の測定において用いたヒト血清 30 検体を用いて、クリニカルケミストリー第 45 巻、10 号（1999 年）に記載されたDCM法（Designated Comparison Method）により当該検体中のHDLコレステロールを測定し、各測定法と比較した。

実施例 21～40 および比較例 5～8 それぞれの測定法と、DCM法による測定法との相関係数を表 1 に示す。

表 1

測定	キット	胆汁酸誘導体	コレステロールエステル加水分解酵素	BSA	相関係数
実施例 2 1	実施例 1	コール酸ナトリウム	VFM-4101で修飾したLPL311	-	0.934
実施例 2 2	実施例 2	コール酸ナトリウム	VFM-4101で修飾したLPL311	+	0.928
実施例 2 3	実施例 3	タウロコール酸ナトリウム	VFM-4101で修飾したLPL311	-	0.889
実施例 2 4	実施例 4	タウロコール酸ナトリウム	VFM-4101で修飾したLPL311	+	0.869
実施例 2 5	実施例 5	BIGCHAP	VFM-4101で修飾したLPL311	-	0.991
実施例 2 6	実施例 6	BIGCHAP	VFM-4101で修飾したLPL311	+	0.983
実施例 2 7	実施例 7	CHAPS	VFM-4101で修飾したLPL311	-	0.986
実施例 2 8	実施例 8	CHAPS	VFM-4101で修飾したLPL311	+	0.984
比較例 5	比較例 1	-	VFM-4101で修飾したLPL311	-	0.013
比較例 6	比較例 2	-	VFM-4101で修飾したLPL311	+	0.008
実施例 2 9	実施例 9	コール酸ナトリウム	LPL6 (無修飾)	+	0.981
実施例 3 0	実施例 1 0	コール酸ナトリウム	LPL6 (無修飾)	-	0.774
実施例 3 1	実施例 1 1	タウロコール酸ナトリウム	LPL6 (無修飾)	+	0.983
実施例 3 2	実施例 1 2	タウロコール酸ナトリウム	LPL6 (無修飾)	-	0.726
実施例 3 3	実施例 1 3	BIGCHAP	LPL6 (無修飾)	-	0.968
実施例 3 4	実施例 1 4	BIGCHAP	LPL6 (無修飾)	+	0.991
実施例 3 5	実施例 1 5	CHAPS	LPL6 (無修飾)	-	0.977
実施例 3 6	実施例 1 6	CHAPS	LPL6 (無修飾)	+	0.994
比較例 7	比較例 3	-	LPL6 (無修飾)	-	0.414
比較例 8	比較例 4	-	LPL6 (無修飾)	+	0.462
実施例 3 7	実施例 1 7	コール酸ナトリウム	VFM-4101で修飾したCHE2	-	0.948
実施例 3 8	実施例 1 8	コール酸ナトリウム	MEAC-50HSで修飾したLPL311	-	0.960
実施例 3 9	実施例 1 9	コール酸ナトリウム	AKM-1510で修飾したLPL311	-	0.935
実施例 4 0	実施例 2 0	コール酸ナトリウム	COE313	-	0.916

実施例 2 1～2 8 の結果から明らかなように、コレステロールエステル加水分解酵素として化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素を用いた場合には、アルブミンの有無にかかわらず、コール酸、タウロコール酸、BIGCHAP、CHAPSのいずれの胆汁酸誘導体の存在下でも、DCM法による測定との間に良い相関が認められたが、比較例 5 および 6 に示されているように、胆汁酸誘導体の非存在下では、アルブミンの有無にかかわらず、DCM法による測定との間に良い相関が認められなかった。

一方、実施例 2 9 と実施例 3 0、実施例 3 1 と実施例 3 2、実施例 3 3 と

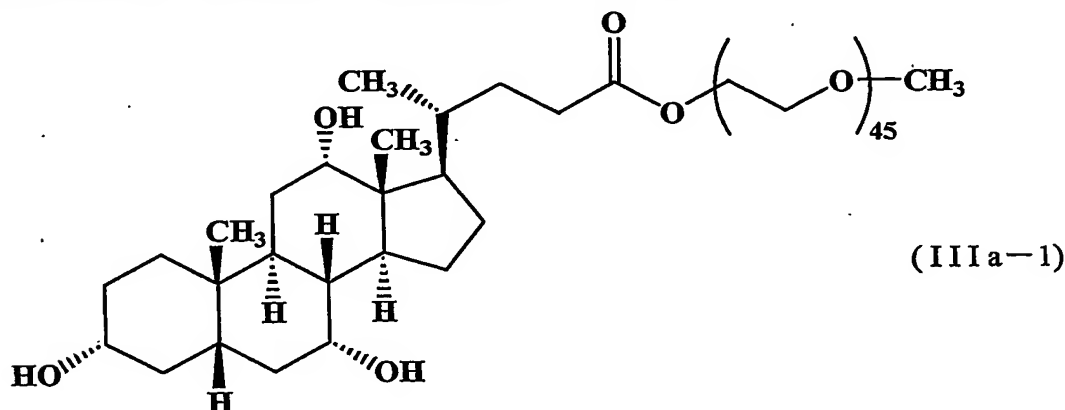
実施例 3 4、実施例 3 5 と実施例 3 6 との比較から、コレステロールエステル加水分解酵素として無修飾の酵素を用いた場合には、胆汁酸誘導体としてコール酸またはタウロコール酸を存在させた条件下では、アルブミンを添加した方が DCM 法による測定との間の相関が良好であったが、胆汁酸誘導体として BIGCHAP または CHAPS を存在させた条件下では、アルブミンの有無にかかわらず、DCM 法による測定との間に良い相関が得られることが判明した。

また、実施例 2 1 と実施例 3 7 との比較より、化学修飾 LPL 3 1 1 以外の化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素を用いた測定においても、DCM 法による測定との間に良い相関が得られることが判明した。さらに、実施例 2 1 と実施例 3 8 との比較、および、実施例 2 1 と実施例 3 9 との比較より、化学修飾剤として、VFM-4 1 0 1 以外の修飾剤を用いて調製した化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素を用いた場合においても、DCM 法による測定との間に良い相関が得られることが判明した。また、実施例 2 1 と実施例 4 0 との比較より、化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素として市販品を用いた場合においても、DCM 法による測定との間に良い相関が得られることが判明した。

#### 実施例 4 1 コール酸エステル [化合物 (I I I a-1)] の合成

滴下装置、攪拌装置、温度計、冷却管および窒素ガス導入管を備えたフラスコ内に、ポリエチレングリコール メチル エーテル (平均分子量 2000、アルドリッチ社製) 110 g (55 mmol)、ジメチルアミノピリジン (広栄化学工業社製) 6.7 g (55 mmol) およびジクロロメタン 100 mL を加え、溶解した。その溶解液にコール酸 (ミクニ化学産業社製) 20.4 g (50 mmol)、次いで、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジミドの塩酸塩 (アイバイツ社製) 10.5 g (55 mmol) を加えた。窒素雰囲気下で 12 時間室温攪拌し、ジクロロメタン 200 mL、水 300 mL を加え、抽出した。有機層を 0.2 mol/L の

塩酸 200 mL にて洗浄し、10%食塩水 300 mL で2回洗浄した。その後、分離した有機層に酢酸エチル 500 mL を加え、10%食塩水 300 mL で3回洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、乾燥剤をろ過除去して、ろ液をロータリーエバポレーターを用いて濃縮した。さらに、真空ポンプを用いて 80℃ で2時間減圧乾燥し、化合物 (IIIa-1) 115 g (収率 96%) を白色のロウ状固体として得た。

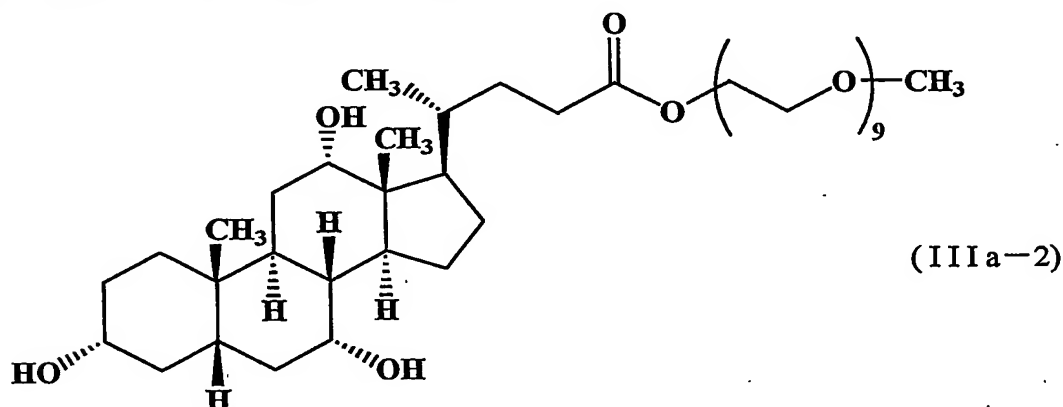


$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm, 400MHz) : 0.69 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.98 (d,  $J=6.0\text{Hz}$ , 3H), 0.98–2.40 (m, 27H), 3.38 (s, 3H), 3.64 (bs, 179H), 3.97 (s, 2H), 4.22 (m, 2H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm, 100MHz) : 12.5, 17.3, 22.5, 23.2, 26.4, 27.5, 28.3, 30.4, 30.8, 31.1, 34.7, 35.2, 35.3, 39.5, 39.6, 41.5, 41.7, 46.4, 47.0, 59.0, 63.4, 68.2, 69.1, 70.5, 70.9, 71.7, 71.9, 72.9, 174.2. IR (KBr Disk,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 2887, 1734, 1468, 1343, 1149, 1111, 1060, 963, 842. GPC (平均分子量) :  $M_w$  2390 ( $M_w/M_n$  1.05).

#### 実施例 42 コール酸エステル [化合物 (IIIa-2)] の合成

フラスコ内に、ポリエチレングリコール メチル エーテル (平均分子量 400、日本油脂社製ユニオックスM-400) 4.8 g (12 mmol)、ジメチルアミノピリジン (広栄化学工業社製) 1.46 g (12 mmol) およびジクロロメタン 30 mL を加え、溶解した。その溶解液にコール酸 (ミニクニ化学産業社製) 4.08 g (10 mmol)、次いで、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジミドの塩酸塩 (アイバイツ社製) 2.3 g (12 mmol) を加えた。窒素雰囲気下で12時間室温撹拌し、

ジクロロメタン 20 mL、水 50 mL を加え、抽出した。有機層を 0.2 mol/L の塩酸 50 mL にて洗浄し、10% 食塩水 50 mL で 2 回洗浄した。その後、分離した有機層に酢酸エチル 100 mL を加え、10% 食塩水 100 mL で 3 回洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、乾燥剤をろ過除去して、ろ液をロータリーエバポレーターを用いて濃縮した。さらに、真空ポンプを用いて 80℃ で 2 時間減圧乾燥し、化合物 (IIIa-2) 7.8 g (収率 95%) を無色油状物質として得た。

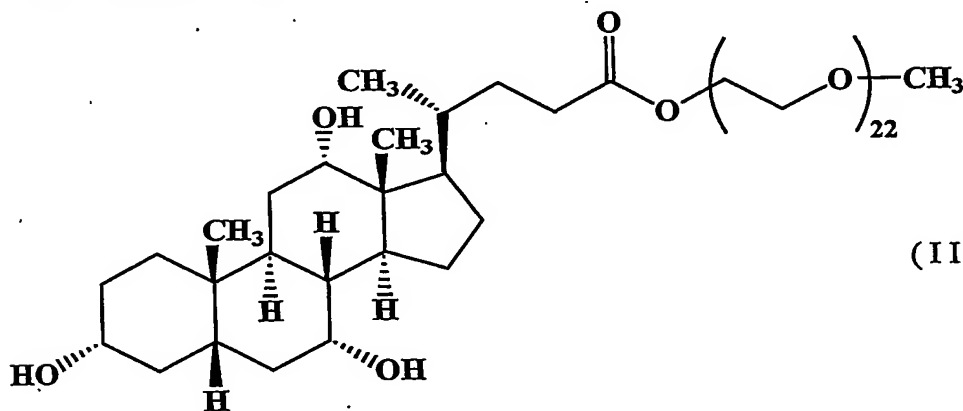


$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm, 400MHz): 0.68 (s, 3H), 0.89 (s, 3H), 0.98 (d,  $J=6.0\text{Hz}$ , 3H), 0.98-2.31 (m, 27H), 3.38 (s, 3H), 3.45 (bs, 1H), 3.55 (bs, 2H), 3.65 (bs, 32H), 3.85 (bs, 1H), 3.96 (bs, 1H), 4.22 (bs, 2H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm, 100MHz): 12.5, 17.3, 22.5, 23.2, 26.3, 27.5, 28.2, 30.4, 30.9, 31.2, 34.7, 34.8, 35.3, 39.5, 41.5, 41.6, 46.4, 47.0, 59.0, 63.4, 68.4, 69.2, 70.6, 71.8, 71.9, 73.0, 174.3. IR (KBr Disk,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2931, 2868, 1734, 1451, 1375, 1299, 1251, 1110, 1111, 1045, 950, 856. GPC (平均分子量):  $M_w$  820 ( $M_w/M_n$  1.04).

#### 実施例 43 コール酸エステル [化合物 (IIIa-3)] の合成

フラスコ内に、ポリエチレングリコール メチル エーテル (平均分子量 1000、日本油脂社製ユニオックス M-1000) 12 g (12 mmol)、ジメチルアミノピリジン (広栄化学工業社製) 1.46 g (12 mmol) およびジクロロメタン 50 mL を加え、溶解した。その溶解液にコール酸 (ミニ化学産業社製) 4.08 g (10 mmol)、次いで、1-エチル-3

— (3-ジメチルアミノプロピル) カルボジミドの塩酸塩 (アイバイツ社製) 2.3 g (12 mmol) を加えた。窒素雰囲気下で12時間室温攪拌し、ジクロロメタン30 mL、水50 mLを加え、抽出した。有機層を0.2 mol/Lの塩酸50 mLにて洗浄し、10%食塩水50 mLで2回洗浄した。その後、分離した有機層に酢酸エチル200 mLを加え、10%食塩水200 mLで3回洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、乾燥剤をろ過除去して、ロータリーエバポレーターを用いて、ろ液を濃縮した。さらに、真空ポンプを用いて80℃で2時間減圧乾燥し、化合物 (IIIa-3) 13.2 g (収率95%) を白色のロウ状固体として得た。



(IIIa-3)

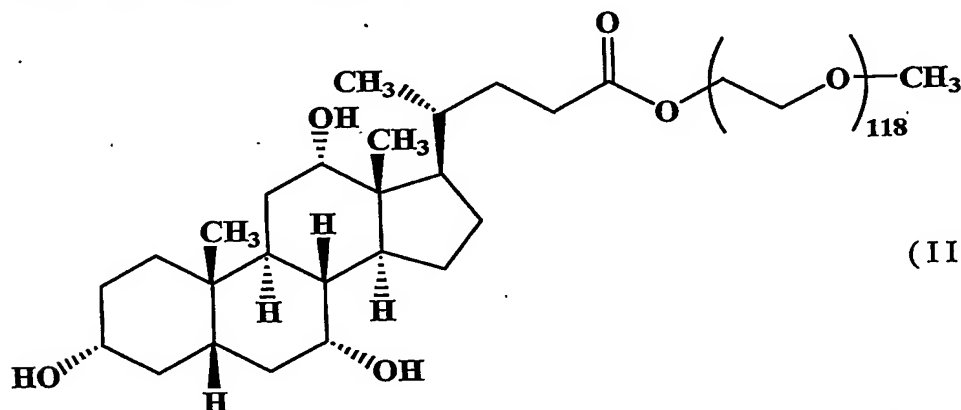
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm, 400MHz): 0.68 (s, 3H), 0.89 (s, 3H), 0.98 (d,  $J=6.2\text{Hz}$ , 3H), 0.98-2.45 (m, 27H), 3.38 (s, 3H), 3.46 (bs, 1H), 3.55 (bs, 2H), 3.64 (bs, 84H), 3.84 (bs, 1H), 3.96 (bs, 1H), 4.22 (bs, 2H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm, 100MHz): 12.5, 17.3, 22.5, 23.2, 26.4, 27.5, 28.3, 30.4, 30.8, 31.2, 34.8, 35.3, 39.5, 41.5, 41.7, 46.4, 47.0, 59.0, 63.4, 68.3, 69.1, 70.5, 70.9, 71.8, 71.9, 72.9, 174.2. IR (KBr Disk,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2870, 1732, 1466, 1345, 1112, 950, 844. GPC (平均分子量):  $M_w$  1430 ( $M_w/M_n$  1.04).

#### 実施例44 コール酸エステル [化合物 (IIIa-4)] の合成

フラスコ内に、ポリエチレングリコール メチル エーテル (平均分子量 5000、アルドリッチ社製) 55 g (約11 mmol)、ジメチルアミノピリジン (広栄化学工業社製) 1.46 g (12 mmol) およびジクロロ



メタン100mLを加え、溶解した。その溶解液にコール酸（ミクニ化学産業社製）4.08g（10mmol）、次いで、1-エチルー3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジミドの塩酸塩（アイバイツ社製）2.3g（12mmol）を加えた。窒素雰囲気下で12時間室温攪拌し、ジクロロメタン50mL、水50mLを加え、抽出した。有機層を0.2mol/Lの塩酸50mLにて洗浄し、10%食塩水50mLで2回洗浄した。その後、分離した有機層に酢酸エチル300mLを加え、10%食塩水300mLで3回洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、乾燥剤をろ過除去して、ろ液をロータリーエバポレーターを用いて濃縮した。さらに、真空ポンプを用いて80℃で2時間減圧乾燥し、化合物（IIIa-4）48.5g（収率90%）を白色のロウ状固体として得た。

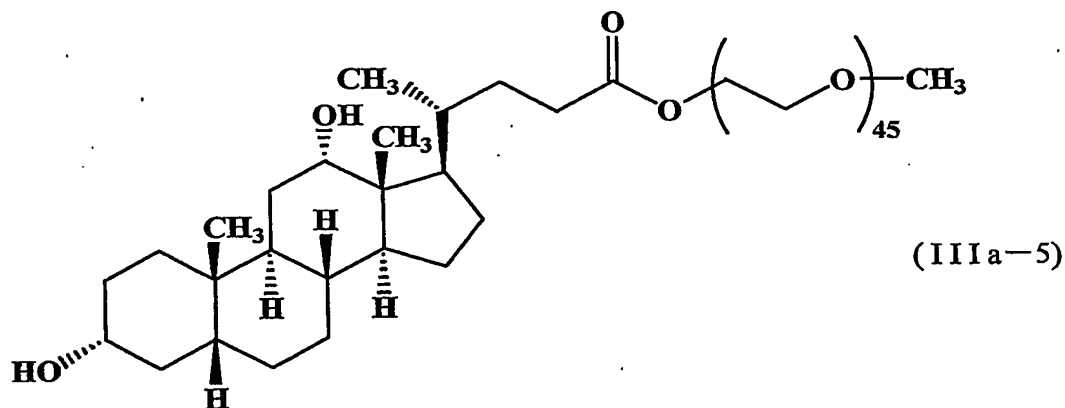


(IIIa-4)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm, 400MHz) : 0.69 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.98 (d,  $J=6.2\text{Hz}$ , 3H), 0.98–2.43 (m, 27H), 3.45 (s, 3H), 3.56 (bs, 473H), 4.22 (bs, 2H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm, 100MHz) : 12.5, 17.2, 22.5, 23.1, 26.4, 27.4, 28.3, 30.4, 30.8, 31.0, 34.6, 34.7, 35.1, 35.3, 39.5, 39.6, 41.5, 41.6, 46.3, 46.8, 58.9, 59.0, 61.4, 63.3, 67.9, 69.0, 69.6, 70.2, 70.5, 70.7, 71.0, 71.3, 71.5, 71.8, 72.5, 174.0. IR (KBr Disk,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 2888, 1734, 1468, 1343, 1281, 1112, 963, 842. GPC (平均分子量) :  $M_w$  5370 ( $M_w/M_n$  1.04).

実施例45 デオキシコール酸エステル [化合物 (IIIa-5)] の合成  
 フラスコ内に、ポリエチレングリコール メチル エーテル (平均分子量

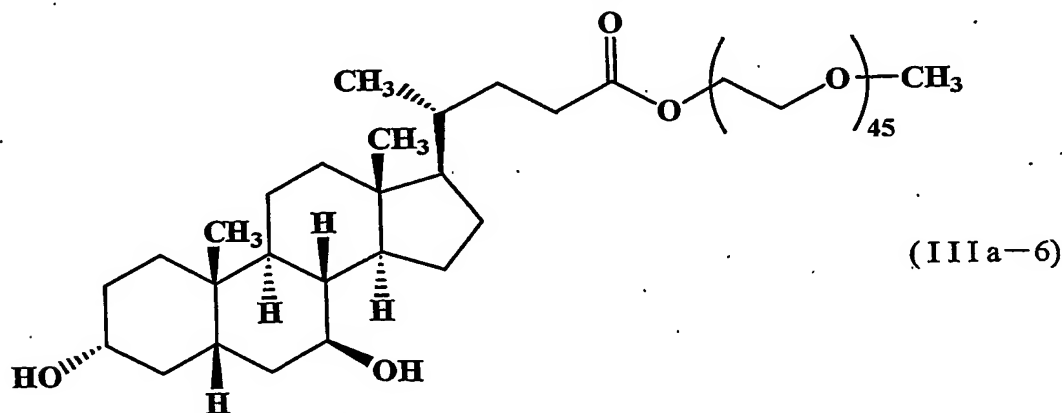
2000、アルドリッチ社製) 22 g (11 mmol)、ジメチルアミノピリジン (広栄化学工業社製) 1.34 g (11 mmol) およびジクロロメタン 50 mL を加え、溶解した。その溶解液にデオキシコール酸 3.93 g (10 mmol)、次いで、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジミドの塩酸塩 (アイバイツ社製) 2.3 g (12 mmol) を加えた。窒素雰囲気下で12時間室温攪拌し、ジクロロメタン 50 mL、水 50 mL を加え、抽出した。有機層を0.2 mol/L の塩酸 50 mL にて洗浄し、10%食塩水 50 mL で2回洗浄した。その後、分離した有機層に酢酸エチル 200 mL を加え、10%食塩水 300 mL で3回洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、乾燥剤をろ過除去して、ろ液をロータリーエバポレーターを用いて濃縮した。さらに、真空ポンプを用いて80℃で2時間減圧乾燥し、化合物 (IIIa-5) 24.2 g (収率99%) を白色のロウ状固体として得た。



$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm, 400MHz): 0.68 (s, 3H), 0.91 (s, 3H), 0.98 (d,  $J=6.3\text{Hz}$ , 3H), 0.98-2.45 (m, 28H), 3.38 (s, 3H), 3.47 (bs, 1H), 3.65 (bs, 178H), 3.80 (bs, 1H), 4.22 (bs, 2H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm, 100MHz): 12.7, 17.3, 23.2, 26.1, 27.1, 27.4, 28.7, 30.4, 30.8, 31.1, 33.6, 34.1, 35.1, 35.3, 36.0, 37.0, 42.0, 46.4, 47.2, 48.2, 59.0, 61.6, 63.4, 69.1, 70.3, 70.5, 70.9, 71.2, 71.9, 72.6, 72.9, 174.1. IR (KBr Disk,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2889, 1735, 1468, 1343, 1281, 1112, 963, 842. GPC (平均分子量):  $M_w$  2510 ( $M_w/M_n$  1.08).

# 実施例 46 ウルソデオキシコール酸エステル [化合物 (IIIa-6)] の合成

フラスコ内に、ポリエチレングリコールメチル エーテル (平均分子量 2000、アルドリッチ社製) 22 g (11 mmol)、ジメチルアミノピリジン (広栄化学工業社製) 1.34 g (11 mmol) およびジクロロメタン 50 mL を加え、溶解した。その溶解液にウルソデオキシコール酸 3.93 g (10 mmol)、次いで、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジミドの塩酸塩 (アイバイツ社製) 2.3 g (12 mmol) を加えた。窒素雰囲気下で 12 時間室温攪拌し、ジクロロメタン 50 mL、水 50 mL を加え、抽出した。有機層を 0.2 mol/L の塩酸 50 mL にて洗浄し、10% 食塩水 50 mL で 2 回洗浄した。その後、分離した有機層に酢酸エチル 200 mL を加え、10% 食塩水 300 mL で 3 回洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、乾燥剤をろ過除去して、ろ液を濃縮した。さらに、真空ポンプを用いて 80℃ で 2 時間減圧乾燥し、化合物 (IIIa-6) 23.7 g (収率 99%) を白色のロウ状固体として得た。

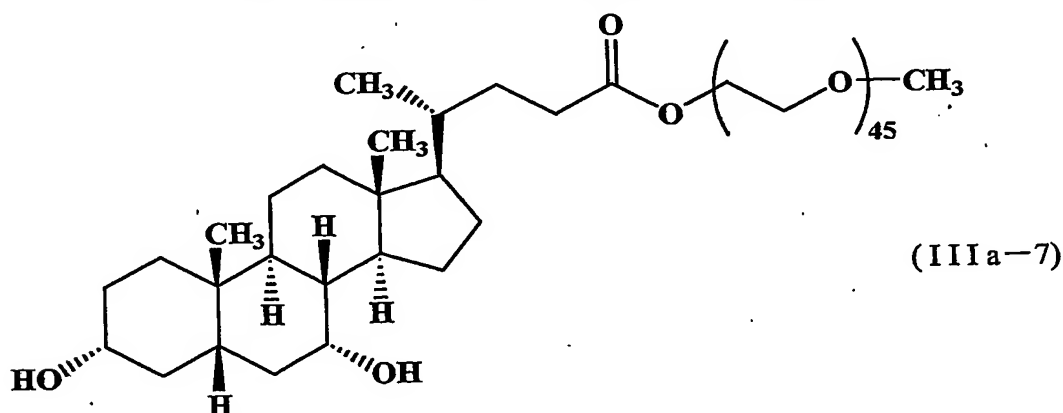


$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm, 400MHz): 0.68 (s, 3H), 0.92 (d,  $J=6.3\text{Hz}$ , 3H), 0.95 (s, 3H), 0.96-2.45 (m, 28H), 3.38 (s, 3H), 3.65 (bs, 18OH), 4.22 (bs, 2H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm, 100MHz): 12.1, 18.4, 23.4, 26.9, 28.5, 30.3, 30.9, 31.1, 34.0, 35.0, 35.2, 37.1, 37.3, 39.1, 40.1, 42.4, 43.7, 54.9, 55.8, 59.0, 61.6, 63.3, 69.1, 70.3, 70.5, 70.8, 71.0, 71.1, 71.9, 72.5, 174.0. IR (KBr Disk,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2889, 1736, 1468, 1343, 1281, 1112, 963,

842. GPC (平均分子量) :  $M_w$  2530 ( $M_w/M_n$  1.08) .

# 実施例 47 ケノデオキシコール酸エステル [化合物 (IIIa-7)] の合成

フラスコ内に、ポリエチレングリコール メチル エーテル (平均分子量 2000、アルドリッチ社製) 22 g (11 mmol)、ジメチルアミノピリジン (広栄化学工業社製) 1.34 g (11 mmol) およびジクロロメタン 50 mL を加え、溶解した。その溶解液にケノデオキシコール酸 3.93 g (10 mmol)、次いで、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジミドの塩酸塩 (アイバイツ社製) 2.3 g (12 mmol) を加えた。窒素雰囲気下で 12 時間室温攪拌し、ジクロロメタン 50 mL、水 50 mL を加え、抽出した。有機層を 0.2 mol/L の塩酸 50 mL にて洗浄し、10% 食塩水 50 mL で 2 回洗浄した。その後、分離した有機層に酢酸エチル 200 mL を加え、10% 食塩水 300 mL で 3 回洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、乾燥剤をろ過除去して、ろ液を濃縮した。さらに、真空ポンプを用いて 80 °C で 2 時間減圧乾燥し、化合物 (IIIa-7) 23.2 g (収率 97%) を白色のロウ状固体として得た。

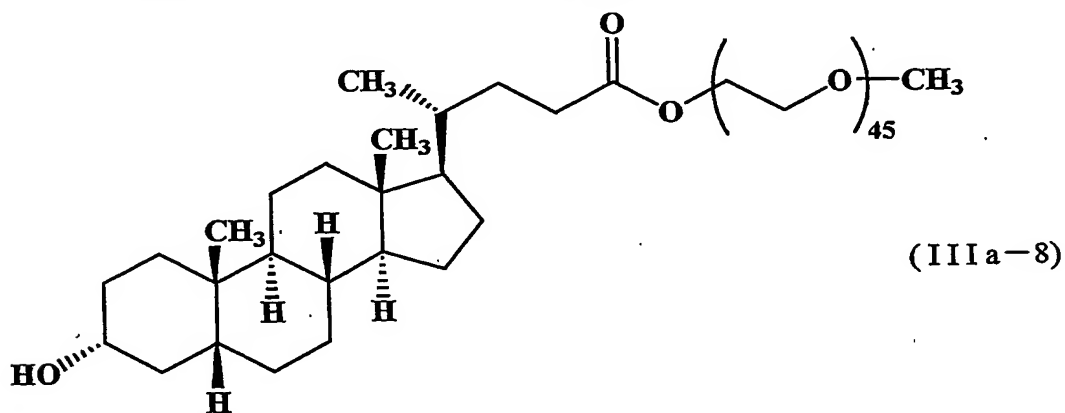


$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm, 400MHz) : 0.66 (s, 3H), 0.91 (s, 3H), 0.92 (d,  $J=6.3\text{Hz}$ , 3H), 0.92-2.43 (m, 28H), 3.38 (s, 3H), 3.64 (bs, 180H), 4.22 (bs, 2H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm, 100MHz) : 11.8, 18.3, 22.8, 23.6, 28.1, 30.6, 30.9, 31.0, 32.8, 34.7, 35.0, 35.3, 35.4, 39.4, 39.6, 39.8, 41.5, 42.6, 50.4, 55.7, 59.0, 61.6, 63.3, 68.2, 69.1, 69.6, 70.3, 70.5, 70.8,

71.4, 71.7, 71.9, 72.6, 174.1. IR (KBr Disk,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2889, 1736, 1468, 1343, 1281, 1111, 963, 842. GPC (平均分子量): Mw 2560 (Mw/Mn 1.09).

#### 実施例 48 リトコール酸エステル [化合物 (IIIa-8)] の合成

フラスコ内に、ポリエチレングリコールメチル エーテル (平均分子量 2000、アルドリッチ社製) 22 g (11 mmol)、ジメチルアミノピリジン (広栄化学工業社製) 1.34 g (11 mmol) およびジクロロメタン 50 mL を加え、溶解した。その溶解液にリトコール酸 3.77 g (10 mmol)、次いで、1-エチルー 3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジミドの塩酸塩 (アイバイツ社製) 2.3 g (12 mmol) を加えた。窒素雰囲気下で 12 時間室温攪拌し、ジクロロメタン 50 mL、水 50 mL を加え、抽出した。有機層を 0.2 mol/L の塩酸 50 mL にて洗浄し、10% 食塩水 50 mL で 2 回洗浄した。その後、分離した有機層に酢酸エチル 200 mL を加え、10% 食塩水 300 mL で 3 回洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、乾燥剤をろ過除去して、ろ液を濃縮した。さらに、真空ポンプを用いて 80°C で 2 時間減圧乾燥し、化合物 (IIIa-8) 23.3 g (収率 98%) を白色のロウ状固体として得た。

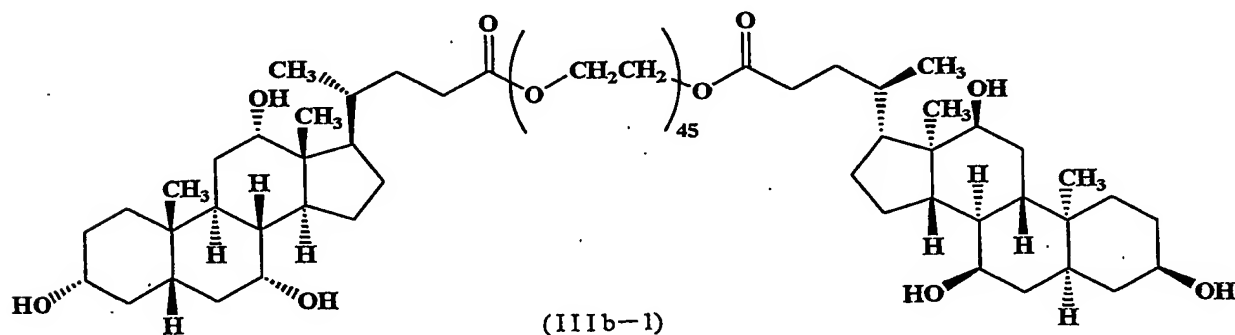


$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm, 400MHz): 0.64 (s, 3H), 0.91 (d,  $J=6.3\text{Hz}$ , 3H), 0.92 (s, 3H), 0.92-2.41 (m, 29H), 3.38 (s, 3H), 3.64 (bs, 17.9H), 4.22 (bs, 2H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm, 100MHz): 12.0, 18.3, 20.8, 23.4, 24.2, 26.4, 27.2, 28.1, 30.5, 30.9, 31.1, 34.5, 35.3, 35.4, 35.8, 36.4, 40.1, 40.4, 42.0, 42.7, 55.9, 56.4, 59.0, 61.6, 63.3, 69.1, 69.7, 70.3, 70.5,

70.6, 70.7, 70.8, 71.1, 71.5, 71.9, 72.6, 174.1. IR (KBr Disk,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2888, 1736, 1468, 1343, 1281, 1111, 963, 842. GPC (平均分子量): Mw 2640 (Mw/Mn 1.06).

#### 実施例 49 両末端コール酸エステル [化合物 (IIIb-1)] の合成

フラスコ内に、ポリエチレングリコール (第一工業製薬社製、PEG 2000) 10 g (5 mmol)、ジメチルアミノピリジン (広栄化学工業社製) 2.68 g (22 mmol) およびジクロロメタン 50 mL を加え、溶解した。その溶解液にコール酸 4.08 g (10 mmol)、次いで、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジミドの塩酸塩 (アイバイツ社製) 4.6 g (24 mmol) を加えた。窒素雰囲気下で 12 時間室温撹拌し、ジクロロメタン 50 mL、水 50 mL を加え、抽出した。有機層を 0.2 mol/L の塩酸 50 mL にて洗浄し、10% 食塩水 50 mL で 2 回洗浄した。その後、分離した有機層に酢酸エチル 200 mL を加え、10% 食塩水 300 mL で 3 回洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、乾燥剤をろ過除去して、ろ液を濃縮した。さらに、真空ポンプを用いて 80°C で 2 時間減圧乾燥し、化合物 (IIIb-1) 13.2 g (収率 94%) を白色のロウ状固体として得た。

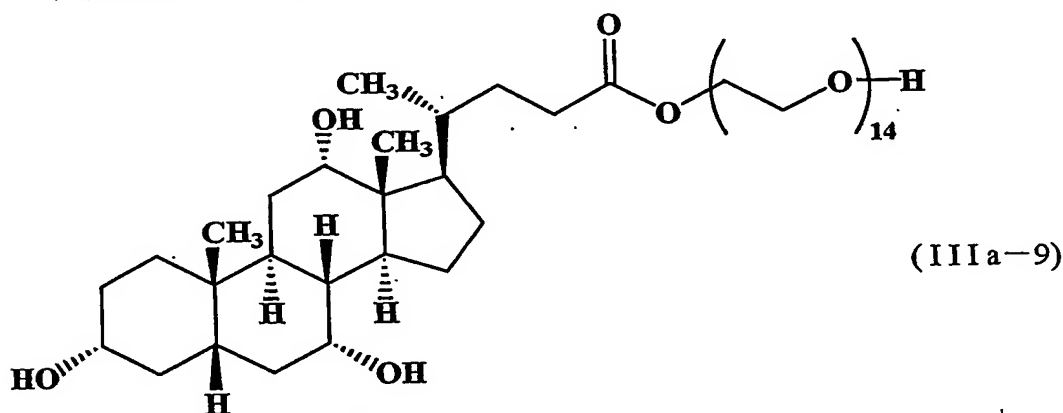


$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm, 400MHz): 0.68 (s, 6H), 0.90 (s, 6H), 0.99 (d,  $J=6.1\text{Hz}$ , 6H), 0.92–2.67 (m, 54H), 3.65 (bs, 180H), 3.96 (bs, 2H), 4.22 (bs, 4H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm, 100MHz): 12.5, 17.3, 22.4, 23.2, 26.3, 27.5, 28.2, 30.3, 30.8, 31.2, 34.7, 35.3, 39.5, 41.5, 41.6, 46.4, 46.5, 46.9, 61.6, 63.4, 68.3, 69.1, 69.7, 70.2, 70.4, 70.5, 70.6, 70.8, 71.3,

71.7, 72.6, 72.9, 174.2. IR (KBr Disk,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2885, 1734, 1468, 1345, 1281, 1113, 964, 842 GPC (平均分子量):  $M_w$  2940 ( $M_w/M_n$  1.05).

#### 実施例 50 コール酸エステル [化合物 (IIIa-9)] の合成

フラスコ内に、ポリエチレングリコール (第一工業製薬社製、PEG 600) 12 g (20 mmol)、ジメチルアミノピリジン (広栄化学工業社製) 1.5 g (12 mmol) およびジクロロメタン 50 mL を加え、溶解した。その溶解液にコール酸 4.08 g (10 mmol)、次いで、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジミドの塩酸塩 (アイバイツ社製) 2.3 g (12 mmol) を加えた。窒素雰囲気下で 12 時間室温攪拌し、ジクロロメタン 50 mL、水 50 mL を加え、抽出した。有機層を 0.2 mol/L の塩酸 50 mL にて洗浄し、10% 食塩水 50 mL で 2 回洗浄した。その後、分離した有機層に酢酸エチル 200 mL を加え、10% 食塩水 300 mL で 3 回洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、乾燥剤をろ過除去して、ろ液を濃縮した。さらに、真空ポンプを用いて 80 °C で 2 時間減圧乾燥し、化合物 (IIIa-9) 7.7 g (収率 90%) を白色のロウ状固体として得た。

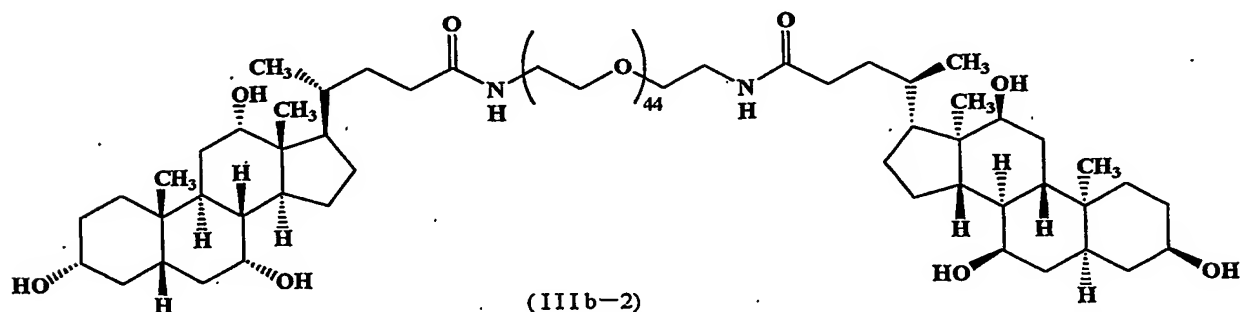


$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm, 400 MHz): 0.68 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.98 (d,  $J=6.1\text{ Hz}$ , 3H), 0.92-2.50 (m, 27H), 3.15 (bs, 1H), 3.44 (bs, 1H), 3.66 (bs, 54H), 3.84 (bs, 1H), 3.96 (bs, 1H), 4.23 (bs, 2H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm, 100 MHz): 12.5, 17.3, 22.5, 23.2, 26.3, 27.5, 28.2, 30.3, 30.8, 31.2, 34.7, 34.8, 35.3, 35.4, 39.5, 41.5, 46.4, 47.0, 61.5, 63.4, 68.3,

69.1, 69.7, 70.2, 70.5, 71.8, 72.6, 73.0, 174.3. IR (KBr Disk,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3404, 2929, 2868, 1732, 1453, 1352, 1251, 1103, 951. GPC (平均分子量): Mw 1050 (Mw/Mn 1.05).

#### 実施例 5 1 コール酸アミド [化合物 (IIIb-2)] の合成

フラスコ内に、ポリオキシエチレンジアミン (平均分子量 2000、川研ファインケミカル社製 PEO アミン # 2000) 10 g (5 mmol)、4-ジメチルアミノピリジン (広栄化学工業社製) 2.56 g (21 mmol) およびジクロロメタン 50 mL を加え、溶解した。その溶解液にコール酸 (ミクニ化学産業社製) 4.08 g (10 mmol)、次いで、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジミドの塩酸塩 (アイバイツ社製) 4.6 g (24 mmol) を加えた。窒素雰囲気下で 12 時間室温攪拌し、ジクロロメタン 50 mL、水 50 mL を加え、抽出した。有機層を 0.2 mol/L の塩酸 50 mL にて洗浄し、10% 食塩水 50 mL で 2 回洗浄した。その後、分離した有機層に酢酸エチル 200 mL を加え、10% 食塩水 300 mL で 3 回洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、乾燥剤をろ過除去して、ろ液を濃縮した。さらに、真空ポンプを用いて 80 °C で 2 時間減圧乾燥し、化合物 (IIIb-2) 12.4 g (収率 88%) を白色のロウ状固体として得た。



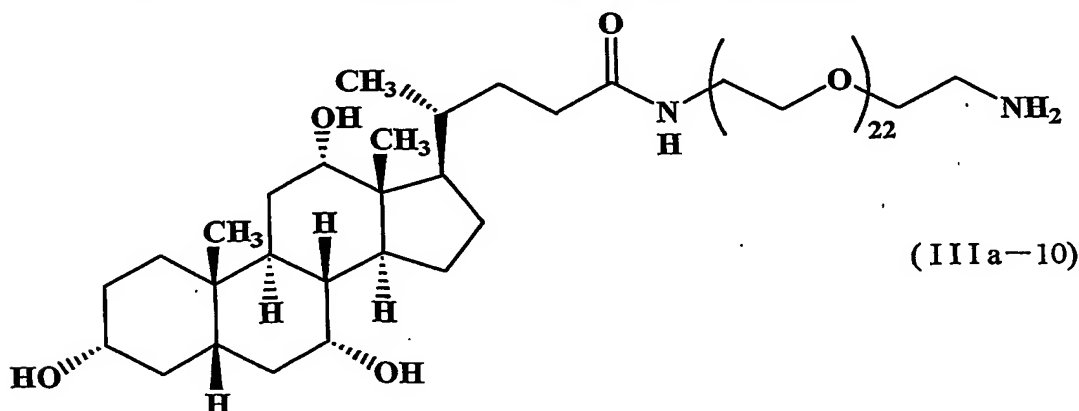
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm, 400MHz): 0.68 (s, 6H), 0.89 (s, 6H), 0.99 (d,  $J=6.1\text{Hz}$ , 6H), 1.12–2.28 (m, 48H), 2.72 (bs, 6H), 3.31 (bs, 2H), 3.34 (bs, 4H), 3.65 (m, 176H), 3.96 (bs, 4H), 4.22 (bs, 2H).  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm, 100MHz): 12.5, 17.4, 22.5, 23.3, 26.3, 27.6, 28.1, 29.1, 30.3,



31.7, 33.2, 34.8, 35.4, 37.5, 39.4, 41.5, 46.3, 46.5, 68.3, 69.7, 70.1, 70.2, 70.5, 70.8, 71.7, 73.0, 174.1. IR (KBr Disk,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3442, 2912, 2871, 1648, 1456, 1352, 1251, 1107, 952. GPC (平均分子量):  $M_w$  2990 ( $M_w/M_n$  1.07).

## 実施例 5 2 コール酸アミド [化合物 (IIIa-10)] の合成

フラスコ内に、ポリオキシエチレンジアミン (平均分子量 1000、川研ファインケミカル社製 PEOアミン #1000) 15 g (15 mmol)、4-ジメチルアミノピリジン (広栄化学工業社製) 1.46 g (12 mmol) およびジクロロメタン 50 mL を加え、溶解した。その溶解液にコール酸 (ミクニ化学産業社製) 4.08 g (10 mmol)、次いで、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジミドの塩酸塩 (アイバイツ社製) 2.3 g (12 mmol) を加えた。窒素雰囲気下で 12 時間室温撹拌し、ジクロロメタン 50 mL、水 50 mL を加え、抽出した。分離した有機層に 1 mol/L 塩酸 22 mL および水 50 mL を加えて洗浄し、さらに、10% 食塩水 50 mL で 2 回洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、乾燥剤をろ過除去し、ろ液をロータリーエバポレーターを用いて濃縮した。さらに、真空ポンプを用いて 80°C で 2 時間減圧乾燥し、化合物 (IIIa-10) 11.9 g (収率 86%) を薄黄色の粘稠な液体として得た。



$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm, 400MHz): 0.68 (s, 3H), 0.89 (s, 3H), 0.99 (d,  $J=7.7\text{Hz}$ , 3H), 0.98-2.28 (m, 24H), 2.89 (bs, 3H), 3.29 (bt,  $J=6.0\text{Hz}$ , 2H), 3.31 (bt,  $J=6.0\text{Hz}$ , 2H), 3.53 (bs, 1H), 3.64 (bs, 84H), 3.83 (bs,

2H), 3.96 (bs, 2H), 4.22 (s, 2H), 7.28 (bs, 1H), 7.85 (bs, 2H).  $^{13}\text{C}$ -NMR (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm, 100MHz): 12.5, 17.3, 17.4, 22.4, 23.3, 26.3, 26.5, 27.6, 28.1, 29.1, 30.3, 31.7, 33.1, 34.7, 34.8, 35.4, 37.3, 39.2, 39.5, 41.6, 46.3, 46.5, 68.2, 69.3, 69.4, 69.6, 70.0, 70.1, 70.2, 70.3, 70.4, , 70.8, 71.7, 73.0, 174.1. IR (KBr Neat, cm<sup>-1</sup>): 3372, 2867, 1648, 1464, 1350, 1298, 1251, 1110, 950. GPC (平均分子量): Mw 1400 (Mw/Mn 1.06).

### 実施例 5 3 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

#### ・第一試薬

HEPES (pH 7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L

#### ・第二試薬

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL 311 (VFM-4101で修飾)	0.2 kU/L
COO 321	5.0 kU/L
化合物 (III a-1)	6.0 g/L

### 実施例 5 4 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

#### ・第一試薬

HEPES (pH 7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
化合物 (III a-2)	0.15 g/L

#### ・第二試薬

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾 LPL 311 (VFM-4101 で修飾)	
	0.2 kU/L
COO321	5.0 kU/L

#### 実施例 55 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなる HDL コレステロール測定用キットを調製した。

##### ・第一試薬

HEPES (pH 7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L

##### ・第二試薬

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾 LPL 311 (VFM-4101 で修飾)	
	0.2 kU/L
COO321	5.0 kU/L
化合物 (IIIIa-3)	1.5 g/L

#### 実施例 56 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなる HDL コレステロール測定用キットを調製した。

##### ・第一試薬

HEPES (pH 7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L

##### ・第二試薬

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
----------------	-----------

4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	2.0 kU/L
化学修飾LPL311 (VFM-4101で修飾)	
	0.2 kU/L
COO321	5.0 kU/L
化合物 (II Ib-2)	1.0 g/L

#### 実施例57 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

##### ・第一試薬

HEPES (pH7.5)	1.0 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
化合物 (II Ia-5)	0.5 g/L

##### ・第二試薬

HEPES (pH7.0)	1.0 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	2.0 kU/L
化学修飾LPL311 (VFM-4101で修飾)	
	0.2 kU/L
COO321	5.0 kU/L

#### 実施例58 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

##### ・第一試薬

HEPES (pH7.5)	1.0 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
BSA	2.0 g/L

##### ・第二試薬

HEPES (pH 7. 0)	1 0 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0. 3 g/L
ペルオキシダーゼ	2 0 kU/L
化学修飾LPL 3 1 1 (VFM-4 1 0 1で修飾)	0. 2 kU/L
COO 3 2 1	5. 0 kU/L
化合物 (I I I a - 1)	6. 0 g/L

#### 実施例 5 9 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

##### ・第一試薬

HEPES (pH 7. 5)	1 0 mmol/L
EMSE	0. 3 g/L
デキストラン硫酸ナトリウム (分子量 5 0 万)	1. 0 g/L

##### ・第二試薬

HEPES (pH 7. 0)	1 0 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0. 3 g/L
ペルオキシダーゼ	2 0 kU/L
化学修飾LPL 3 1 1 (VFM-4 1 0 1で修飾)	0. 2 kU/L
COO 3 2 1	5. 0 kU/L
化合物 (I I I a - 1)	6. 0 g/L

#### 実施例 6 0 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

##### ・第一試薬

HEPES (pH 7. 5)	1 0 mmol/L
EMSE	0. 3 g/L

デキストラン硫酸ナトリウム (分子量 50 万) 1.0 g/L

・ 第二試薬

HEPES (pH 7.0) 10 mmol/L

4-アミノアンチピリン 0.3 g/L

ペルオキシダーゼ 20 kU/L

化学修飾 LPL 311 (VFM-4101 で修飾)

0.2 kU/L

COO321

5.0 kU/L

化合物 (IIIB-2)

1.0 g/L

実施例 61 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなる HDL コレステロール測定用キットを調製した。

・ 第一試薬

HEPES (pH 7.5) 10 mmol/L

EMSE 0.3 g/L

デキストラン硫酸ナトリウム (分子量 50 万) 1.0 g/L

化合物 (IIIA-2) 0.15 g/L

・ 第二試薬

HEPES (pH 7.0) 10 mmol/L

4-アミノアンチピリン 0.3 g/L

ペルオキシダーゼ 20 kU/L

化学修飾 LPL 311 (VFM-4101 で修飾)

0.2 kU/L

COO321

5.0 kU/L

実施例 62 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなる HDL コレステロール測定用キットを調製した。

・ 第一試薬

HEPES (pH 7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
デキストラン硫酸ナトリウム (分子量50万)	1.0 g/L

・ 第二試薬

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L

化学修飾LPL311 (VFM-4101で修飾)

0.2 kU/L

COO321

5.0 kU/L

化合物 (IIIa-3.)

1.5 g/L

実施例63 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

・ 第一試薬

HEPES (pH 7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
BSA	2.0 g/L
デキストラン硫酸ナトリウム (分子量50万)	1.0 g/L

・ 第二試薬

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L

化学修飾LPL311 (VFM-4101で修飾)

0.2 kU/L

COO321

5.0 kU/L

化合物 (IIIa-1)

6.0 g/L

実施例64 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

・ 第一試薬

HEPES (pH 7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
BSA	2.0 g/L
デキストラン硫酸ナトリウム (分子量50万)	1.0 g/L

・ 第二試薬

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL311 (VFM-4101で修飾)	0.2 kU/L
COO321	5.0 kU/L
化合物 (IIIB-2)	1.0 g/L

実施例65 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

・ 第一試薬

HEPES (pH 7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
BSA	2.0 g/L
デキストラン硫酸ナトリウム (分子量50万)	1.0 g/L

・ 第二試薬

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL311 (VFM-4101で修飾)	



COO321

化合物 (IIIa-3)

0.2 kU/L

5.0 kU/L

1.5 g/L

## 比較例9 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

## ・第一試薬

HEPES (pH7.5)

10 mmol/L

EMSE

0.3 g/L

## ・第二試薬

HEPES (pH7.0)

10 mmol/L

4-アミノアンチピリン

0.3 g/L

ペルオキシダーゼ

20 kU/L

化学修飾LPL311 (VFM-4101で修飾)

0.2 kU/L

COO321

5.0 kU/L

## 比較例10 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

## ・第一試薬

HEPES (pH7.5)

10 mmol/L

EMSE

0.3 g/L

BSA

2.0 g/L

## ・第二試薬

HEPES (pH7.0)

10 mmol/L

4-アミノアンチピリン

0.3 g/L

ペルオキシダーゼ

20 kU/L

化学修飾LPL311 (VFM-4101で修飾)

0.2 kU/L

COO321

5.0 kU/L

## 比較例 11 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

・ 第一試薬

HEPES (pH7.5)

1.0 mmol/L

EMSE

0.3 g/L

デキストラン硫酸ナトリウム (分子量50万)

1.0 g/L

・ 第二試薬

HEPES (pH7.0)

1.0 mmol/L

4-アミノアンチピリン

0.3 g/L

ペルオキシダーゼ

2.0 kU/L

化学修飾LPL311 (VFM-4101で修飾)

0.2 kU/L

COO321

5.0 kU/L

## 比較例 12 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

・ 第一試薬

HEPES (pH7.5)

1.0 mmol/L

EMSE

0.3 g/L

BSA

2.0 g/L

デキストラン硫酸ナトリウム (分子量50万)

1.0 g/L

・ 第二試薬

HEPES (pH7.0)

1.0 mmol/L

4-アミノアンチピリン

0.3 g/L

ペルオキシダーゼ

2.0 kU/L

化学修飾 L P L 3 1 1 (V F M - 4 1 0 1 で修飾)

0. 2 k U / L

C O O 3 2 1

5. 0 k U / L

#### 実施例 6 6 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 5 3 のキットを用いる以外は実施例 2 1 の測定法と同様にして、日立 7 1 7 0 型自動分析装置によりヒト血清 3 5 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 実施例 6 7 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 5 4 のキットを用いる以外は実施例 2 1 の測定法と同様にして、日立 7 1 7 0 型自動分析装置によりヒト血清 3 5 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 実施例 6 8 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 5 5 のキットを用いる以外は実施例 2 1 の測定法と同様にして、日立 7 1 7 0 型自動分析装置によりヒト血清 3 5 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 実施例 6 9 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 5 6 のキットを用いる以外は実施例 2 1 の測定法と同様にして、日立 7 1 7 0 型自動分析装置によりヒト血清 3 5 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 実施例 7 0 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 5 7 のキットを用いる以外は実施例 2 1 の測定法と同様にして、日立 7 1 7 0 型自動分析装置によりヒト血清 3 5 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 実施例 7 1 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 5 8 のキットを用いる以外は実施例 2 1 の測定法と同様にして、日立 7 1 7 0 型自動分析装置によりヒト血清 3 5 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 実施例 7 2 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 59 のキットを用いる以外は実施例 21 の測定法と同様にして、日立 7170 型自動分析装置によりヒト血清 35 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 実施例 73 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 60 のキットを用いる以外は実施例 21 の測定法と同様にして、日立 7170 型自動分析装置によりヒト血清 35 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 実施例 74 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 61 のキットを用いる以外は実施例 21 の測定法と同様にして、日立 7170 型自動分析装置によりヒト血清 35 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 実施例 75 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 62 のキットを用いる以外は実施例 21 の測定法と同様にして、日立 7170 型自動分析装置によりヒト血清 35 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 実施例 76 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 63 のキットを用いる以外は実施例 21 の測定法と同様にして、日立 7170 型自動分析装置によりヒト血清 35 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 実施例 77 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 64 のキットを用いる以外は実施例 21 の測定法と同様にして、日立 7170 型自動分析装置によりヒト血清 35 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 実施例 78 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 65 のキットを用いる以外は実施例 21 の測定法と同様にして、日立 7170 型自動分析装置によりヒト血清 35 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 比較例 13 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに比較例 9 のキットを用いる以外は実施例 21 の測定法と同様にして、日立 7170 型自動分析装置によりヒト血清 35 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 比較例 14 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに比較例 10 のキットを用いる以外は実施例 21 の測定法と同様にして、日立 7170 型自動分析装置によりヒト血清 35 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 比較例 15 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに比較例 11 のキットを用いる以外は実施例 21 の測定法と同様にして、日立 7170 型自動分析装置によりヒト血清 35 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 比較例 16 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに比較例 12 のキットを用いる以外は実施例 21 の測定法と同様にして、日立 7170 型自動分析装置によりヒト血清 35 検体中の HDL コレステロールを測定した。一方、実施例 66～78 および比較例 13～16 の測定において用いたヒト血清 35 検体を用いて、DCM 法により当該検体中の HDL コレステロールを測定し、各測定法と比較した。実施例 66～78 および比較例 13～16 それぞれの測定法と、DCM 法による測定法との相関係数を表 2 に示す。

表 2

測定	キット	胆汁酸誘導体	B S A	デキストラン 硫酸	相関係数
実施例 6 6	実施例 5 3	化合物 (I I I a-1)	—	—	0. 9 8 3
実施例 6 7	実施例 5 4	化合物 (I I I a-2)	—	—	0. 8 8 2
実施例 6 8	実施例 5 5	化合物 (I I I a-3)	—	—	0. 9 6 7
実施例 6 9	実施例 5 6	化合物 (I I I b-2)	—	—	0. 9 8 4
実施例 7 0	実施例 5 7	化合物 (I I I a-5)	—	—	0. 9 8 5
実施例 7 1	実施例 5 8	化合物 (I I I a-1)	+	—	0. 9 8 9
実施例 7 2	実施例 5 9	化合物 (I I I a-1)	—	+	0. 9 8 7
実施例 7 3	実施例 6 0	化合物 (I I I b-2)	—	+	0. 9 9 6
実施例 7 4	実施例 6 1	化合物 (I I I a-2)	—	+	0. 9 6 2
実施例 7 5	実施例 6 2	化合物 (I I I a-3)	—	+	0. 9 7 7
実施例 7 6	実施例 6 3	化合物 (I I I a-1)	+	+	0. 9 9 0
実施例 7 7	実施例 6 4	化合物 (I I I b-2)	+	+	0. 9 9 1
実施例 7 8	実施例 6 5	化合物 (I I I a-3)	+	+	0. 9 9 0
比較例 1 3	比較例 9		—	—	0. 0 2 0
比較例 1 4	比較例 1 0		+	—	0. 4 2 9
比較例 1 5	比較例 1 1		—	+	0. 0 0 6
比較例 1 6	比較例 1 2		+	+	0. 4 5 1

実施例 6 6～7 0 と比較例 1 3 より、胆汁酸誘導体として胆汁酸エステル類または胆汁酸アミド類を用いた場合において、DCM法による測定との間に良好な相関が得られた。また、実施例 7 1 と比較例 1 4、実施例 7 2～7 5 と比較例 1 5、実施例 7 6～7 8 と比較例 1 6 との対比から、B S A またはデキストラン硫酸を添加した条件下、もしくは両化合物を添加した条件下においても、胆汁酸誘導体として胆汁酸エステル類または胆汁酸アミド類を用いた場合において D C M 法による測定との間に良好な相関係数が得られることが判明した。

試験例 1 各種胆汁酸誘導体（陰イオン性界面活性剤、両性界面活性剤、非

イオン性界面活性剤) がコレステロール測定酵素の安定性へ及ぼす影響

HDLコレステロール測定用キットの第二試薬として使用される下記組成1～8からなる試薬を調製し、それぞれ40℃にて48時間(2日)、120時間(5日)保存した。調製直後の組成1～8からなる各試薬、40℃にて2日間保存した各試薬および40℃にて5日間保存した各試薬におけるコレステロールエステル加水分解酵素(LPL311)およびコレステロール酸化酵素(COO321)それぞれの酵素活性を測定し、調製直後の各試薬における酵素活性に対する保存後の各試薬における酵素活性の比率(酵素活性残存率)(%)を求めた。

酵素活性は以下の方法により求めた。

#### (1) コレステロールエステル加水分解酵素活性測定法

##### 測定試薬

0.15 mol/Lリン酸カリウムバッファー (pH7.2)	
トリトンX-100	2 g/L
フェノール	0.15 g/L
パーオキシダーゼ	20 kU/L
コレステロール酸化酵素	5 kU/L
4-アミノアンチピリン	0.2 g/L

##### 測定基質溶液

コレステロールリノレート イソプロパノール溶液 (6 g/L)

##### 操作法

測定試薬3mLを石英セルに添加し、調製直後の組成1～8からなる各試薬をそれぞれ0.05mL添加する。37℃にて5分加温後、反応液に測定基質溶液を0.1mL添加し、さらに37℃にて加温する。測定基質溶液を添加して5分後および6分後のそれぞれの反応液の500nmにおける吸光度を測定し、当該両吸光度から、組成1～8からなる各試薬における500nmでの1分間当たりの吸光度変化量( $\Delta Abs/min$ )を算出する。一方、組成1～8からなる各試薬の代わりに精製水を用いて同様の測定を行

い、精製水における500nmでの1分間当たりの吸光度変化量( $\Delta Abs / min$ )を算出する。組成1～8からなる各試薬における500nmでの1分間当たりの吸光度変化量( $\Delta Abs / min$ )から精製水における500nmでの1分間当たりの吸光度変化量( $\Delta Abs / min$ )を差し引いて算出された値( $\Delta \Delta Abs / min$ )を、コレステロール加水分解酵素の安定化の指標とする。

同様の一連の操作を、調製直後の組成1～8からなる各試薬の代わりに、組成1～8からなる各試薬を40℃にて2日間保存した各試薬、および、組成1～8からなる各試薬を40℃にて5日間保存した各試薬を用いて測定を行い、各試薬における吸光度変化量( $\Delta \Delta Abs / min$ )を算出する。

## (2) コレステロール酸化酵素活性測定法

### 測定試薬

0.15 mol/Lリン酸カリウムバッファー (pH 7.2)

トリトンX-100                      2 g/L

フェノール                              0.15 g/L

パーオキシダーゼ                      20 kU/L

4-アミノアンチピリン                      0.2 g/L

### 測定基質溶液

コレステロール イソプロパノール溶液 (5 g/L)

### 操作法

測定試薬3mLを石英セルに添加し、調製直後の組成1～8からなる各試薬を精製水で6倍希釈した溶液をそれぞれ0.05mL添加する。37℃にて5分加温後、反応液に測定基質溶液を0.1mL添加し、さらに37℃にて加温する。測定基質溶液を添加して5分後および6分後のそれぞれの反応液の500nmにおける吸光度を測定し、当該両吸光度から、組成1～8からなる各試薬における500nmでの1分間当たりの吸光度変化量( $\Delta Abs / min$ )を算出する。一方、組成1～8からなる試薬の代わりに精製水を用いて同様の測定を行い、精製水における500nmでの1分間当たりの



吸光度変化量 ( $\Delta Abs/min$ ) を算出する。組成 1～8 からなる各試薬における 500 nm での 1 分間当たりの吸光度変化量 ( $\Delta Abs/min$ ) から精製水における 500 nm での 1 分間当たりの吸光度変化量 ( $\Delta Abs/min$ ) を差し引いて算出された値 ( $\Delta \Delta Abs/min$ ) を、コレステロール酸化酵素の安定化の指標とする。

同様の一連の操作を、調製直後の組成 1～8 からなる各試薬の代わりに、組成 1～8 からなる各試薬を 40℃にて 2 日間保存した各試薬、および、組成 1～8 からなる各試薬を 40℃にて 5 日間保存した各試薬を用いて測定を行い、各試薬における吸光度変化量 ( $\Delta \Delta Abs/min$ ) を算出する。

#### 組成 1

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
塩化カルシウム二水和物	0.1 g/L
化学修飾 LPL 311 (VFM 4101 で修飾)	0.2 kU/L

#### 組成 2

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
塩化カルシウム二水和物	0.1 g/L
化学修飾 LPL 311 (VFM 4101 で修飾)	0.2 kU/L
コール酸ナトリウム	6.0 g/L

#### 組成 3

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
塩化カルシウム二水和物	0.1 g/L
化学修飾 LPL 311 (VFM 4101 で修飾)	0.2 kU/L

## CHAPS

6.0 g/L

組成 4

HEPES (pH 7.0)

10 mmol/L

4-アミノアンチピリン

0.3 g/L

ペルオキシダーゼ

20 kU/L

塩化カルシウム二水和物

0.1 g/L

化学修飾 LPL311 (VFM4101 で修飾)

0.2 kU/L

BIGCHAP

4.5 g/L

組成 5

HEPES (pH 7.0)

10 mmol/L

4-アミノアンチピリン

0.3 g/L

ペルオキシダーゼ

20 kU/L

塩化カルシウム二水和物

0.1 g/L

化学修飾 LPL311 (VFM4101 で修飾)

0.2 kU/L

化合物 (II Ia-1)

6.0 g/L

組成 6

HEPES (pH 7.0)

10 mmol/L

4-アミノアンチピリン

0.3 g/L

ペルオキシダーゼ

20 kU/L

塩化カルシウム二水和物

0.1 g/L

化学修飾 LPL311 (VFM4101 で修飾)

0.2 kU/L

化合物 (II Ia-2)

0.45 g/L

組成 7

HEPES (pH 7.0)

10 mmol/L

4-アミノアンチピリン

0.3 g/L

ペルオキシダーゼ

20 kU/L

塩化カルシウム二水和物

0.1 g/L

化学修飾 LPL311 (VFM4101 で修飾)

0.2 kU/L

化合物 (I I I a - 3)

4. 5 g / L

組成 8

HEPES (pH 7. 0)

10 mmol / L

4 - アミノアンチピリン

0. 3 g / L

ペルオキシダーゼ

20 kU / L

塩化カルシウム二水和物

0. 1 g / L

化学修飾 L P L 3 1 1 (V F M 4 1 0 1 で修飾)

0. 2 kU / L

化合物 (I I I b - 2)

1. 0 g / L

測定結果を表 3 に示す。

表 3

組成	胆汁酸誘導体	酵素	酵素活性残存率 (%)	
			40℃2日	40℃5日
1	無添加	LPL311	95.1	92.3
2	コール酸	LPL311	81.6	73.9
3	CHAPS	LPL311	72.3	59.6
4	BIGCHAP	LPL311	90.1	82.4
5	化合物 (IIIa-1)	LPL311	91.4	82.3
6	化合物 (IIIa-2)	LPL311	94.4	89.1
7	化合物 (IIIa-3)	LPL311	93.6	85.3
8	化合物 (IIIb-2)	LPL311	93.2	86.7
1	無添加	COO321	100.3	100.0
2	コール酸	COO321	0	0
3	CHAPS	COO321	79.8	62.0
4	BIGCHAP	COO321	100.0	92.3
5	化合物 (IIIa-1)	COO321	94.9	81.5
6	化合物 (IIIa-2)	COO321	100.7	96.3
7	化合物 (IIIa-3)	COO321	100.6	96.4
8	化合物 (IIIb-2)	COO321	100.4	94.0

表3から明らかなように、胆汁酸誘導体として、陰イオン性型胆汁酸誘導体（具体的には、コール酸）および両性型胆汁酸誘導体（具体的には、CHAPS）を含有する試薬に比較して、非イオン性型胆汁酸誘導体〔具体的には、BIGCHAP、化合物 (IIIa-1)、化合物 (IIIa-2)、化合物 (IIIa-3) および化合物 (IIIb-2)〕を含有する試薬の方が、コレステロール測定用酵素（具体的には、LPL311およびCOO321）の安定性が良好であった。一般に、酵素等の40℃等の高温での保存安定性は、4℃または室温等の保存安定性を反映することが知られている。従って、本発明の高密度リポ蛋白中のコレステロールの測定方法および測定

試薬もしくはキットにおいて、胆汁酸誘導体として、非イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体を用いることにより、長期間保存された試薬を用いた場合であっても、また、保存温度が40℃に晒されたおそれの有る試薬を用いた場合であっても、より正確に高密度リポ蛋白中のコレステロールが測定できることがわかる。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、検体中の高密度リポ蛋白中のコレステロールを簡便かつ正確に測定する方法およびその方法に使用する試薬、ならびに、長期間の保存においても酵素活性が安定に保持される高密度リポ蛋白中のコレステロールを測定するための試薬およびキットが提供される。

## 請求の範囲

1. 検体と、コレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素、または、コレステロールエステル加水分解酵素、酸化型補酵素およびコレステロール脱水素酵素とを、胆汁酸誘導体を含有する水性媒体中で反応させ、生成した過酸化水素または還元型補酵素を測定することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロールを測定する方法。
2. 水性媒体が、さらに、アルブミンを含有する請求項 1 記載の方法。
3. コレステロールエステル加水分解酵素が、化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素である請求項 1 または 2 記載の方法。
4. 化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素が、ポリエチレングリコールを主成分とする基、ポリプロピレングリコールを主成分とする基、ポリプロピレングリコールとポリエチレングリコールの共重合体を有する基、水溶性多糖類を含有する基、スルホプロピル基、スルホブチル基、ポリウレタン基、および、キレート機能を有する基からなる群より選ばれる基により修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素である請求項 3 記載の方法。
5. 化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素が、ポリエチレングリコールを主成分とする基により修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素である請求項 3 記載の方法。
6. 胆汁酸誘導体が、陰イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体である請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の方法。
7. 陰イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体が、コール酸もしくはその塩、タウロコール酸もしくはその塩、グリココール酸もしくはその塩、リトコール酸もしくはその塩、デオキシコール酸もしくはその塩、ケノデオキシコール酸もしくはその塩、ウルソデオキシコール酸もしくはその塩、7-オキシリトコール酸もしくはその塩、12-オキシリトコール酸もしくはその塩、12-オキシケノデオキシコール酸もしくはその塩、7-オキシデオキシコール酸もしくはその塩、ヒオコール酸もしくはその塩、ヒオデオ

キシコール酸もしくはその塩、および、デヒドロコール酸もしくはその塩からなる群より選ばれる胆汁酸誘導体である請求項 6 記載の方法。

8. 胆汁酸誘導体が、両性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体である請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の方法。

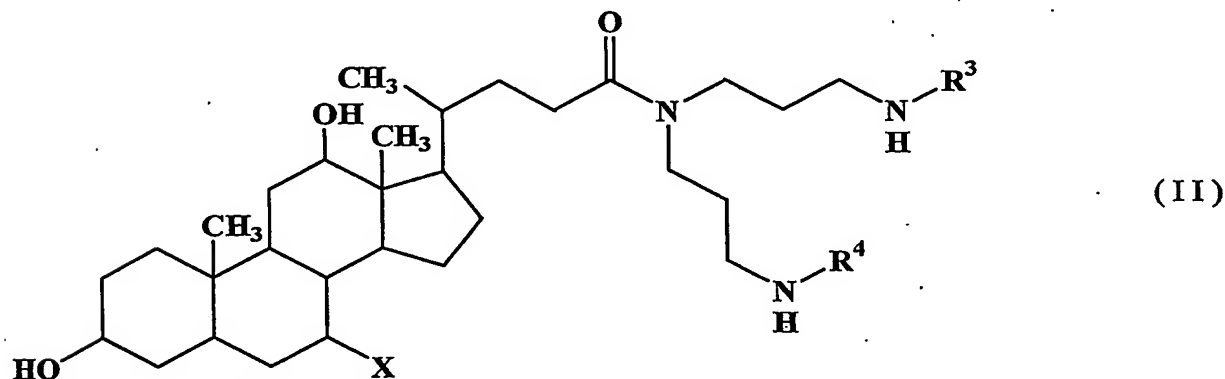
9. 両性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体が、一般式 (I)



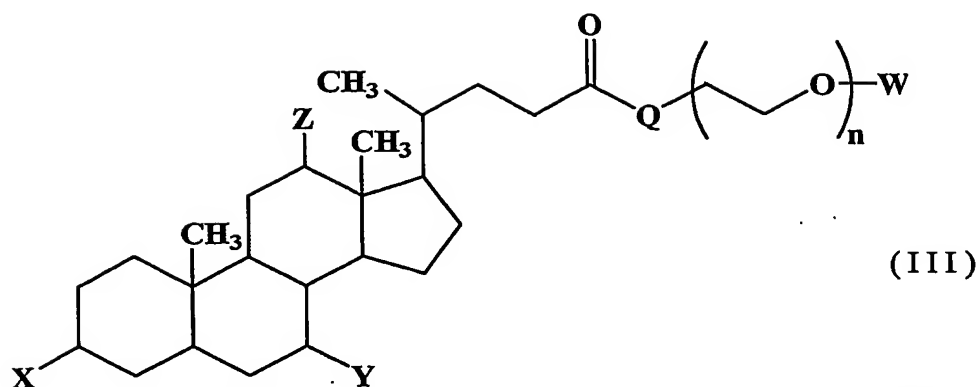
[式中、 $\text{R}^1$ は、3-(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ基であり、 $\text{R}^2$ は、水素原子または水酸基である]で表される化合物である請求項 8 記載の方法。

10. 胆汁酸誘導体が、非イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体である請求項 1 ～ 5 のいずれかに記載の方法。

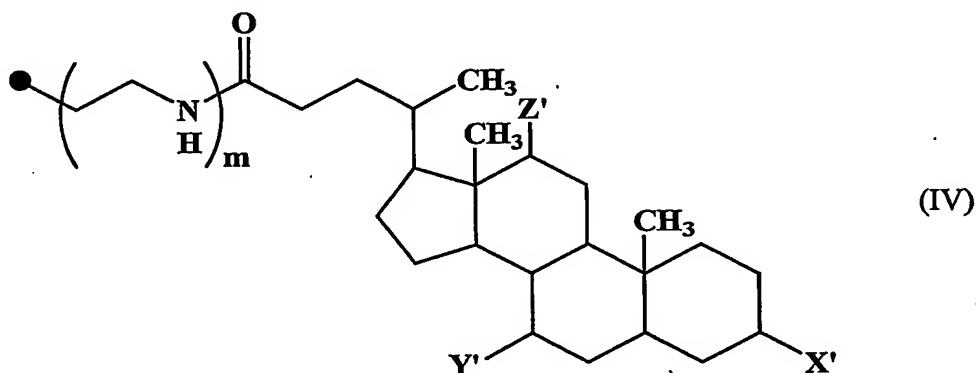
11. 非イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体が、一般式 (II)



(Xは、水素原子または水酸基を表し、 $\text{R}^3$ および $\text{R}^4$ は、同一または異なって、置換もしくは非置換のアルキル基、または、置換もしくは非置換のアルカノイル基を表す)で表される化合物、または、一般式 (III)



{式中、X、YおよびZは、同一または異なって、水素原子、水酸基またはオキシ(=O)基を表し、Qは、酸素原子またはNHを表し、Wは、水素原子、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、アルカノイル基、アルケノイル基、アルキノイル基、置換もしくは非置換のアリール基、置換もしくは非置換のアミノアルキル基、または、一般式(IV)}



[式中、X'、Y'およびZ'は、同一または異なって、水素原子、水酸基またはオキシ(=O)基を表し、mは、0または1を表す]で表される基を表し、nは、3~400の整数を表す}で表される化合物である請求項10記載の方法。

12. コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、胆汁酸誘導体および過酸化水素測定用試薬を含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用試薬。

13. コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、胆汁酸誘導体および酸化型補酵素を含有することを特徴とする高密度リ



が蛋白中のコレステロール測定用試薬。

14. さらに、還元型補酵素測定用試薬を含有する請求項 1 3 記載の試薬。

15. さらに、アルブミンを含有する請求項 1 2 ～ 1 4 のいずれかに記載の試薬。

16. コレステロールエステル加水分解酵素が、化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素である請求項 1 2 ～ 1 5 のいずれかに記載の試薬。

17. 化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素が、ポリエチレングリコールを主成分とする基、ポリプロピレングリコールを主成分とする基、ポリプロピレングリコールとポリエチレングリコールの共重合体を有する基、水溶性多糖類を含有する基、スルホプロピル基、スルホブチル基、ポリウレタン基、および、キレート機能を有する基からなる群より選ばれる基により修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素である請求項 1 6 記載の試薬。

18. 化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素が、ポリエチレングリコールを主成分とする基により修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素である請求項 1 6 記載の試薬。

19. 胆汁酸誘導体が、陰イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体である請求項 1 2 ～ 1 8 のいずれかに記載の試薬。

20. 陰イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体が、コール酸もしくはその塩、タウロコール酸もしくはその塩、グリココール酸もしくはその塩、リトコール酸もしくはその塩、デオキシコール酸もしくはその塩、ケノデオキシコール酸もしくはその塩、ウルソデオキシコール酸もしくはその塩、7-オキシリトコール酸もしくはその塩、12-オキシリトコール酸もしくはその塩、12-オキシケノデオキシコール酸もしくはその塩、7-オキシデオキシコール酸もしくはその塩、ヒオコール酸もしくはその塩、ヒオデオキシコール酸もしくはその塩、および、デヒドロコール酸もしくはその塩か

らなる群より選ばれる胆汁酸誘導体である請求項 19 記載の試薬。

21. 胆汁酸誘導体が、両性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体である請求項 12～18 のいずれかに記載の試薬。

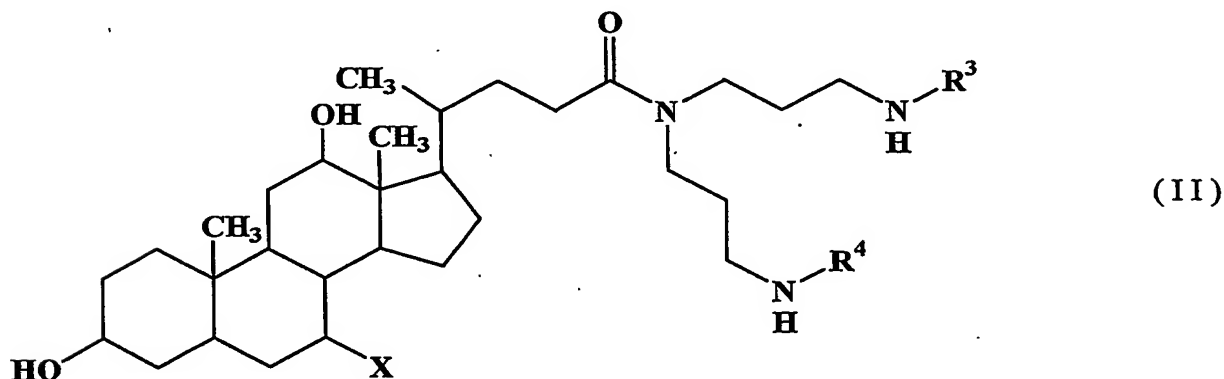
22. 両性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体が、一般式 (I)



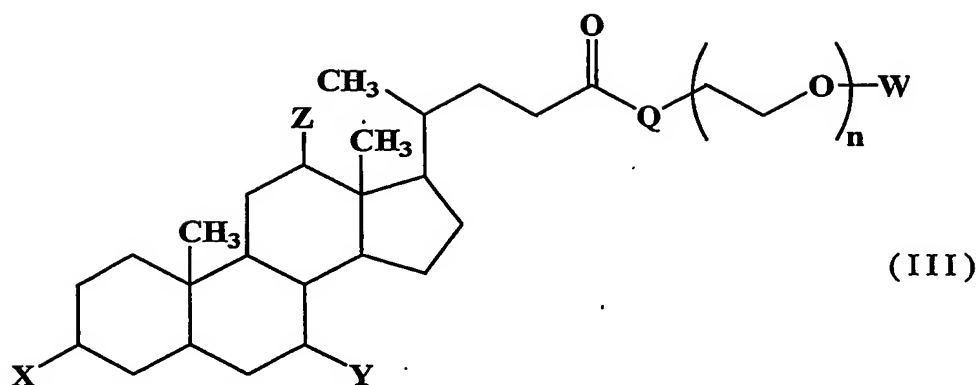
[式中、 $\text{R}^1$ は、3-(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ基であり、 $\text{R}^2$ は、水素原子または水酸基である]で表される化合物である請求項 21 記載の試薬。

23. 胆汁酸誘導体が、非イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体である請求項 12～18 のいずれかに記載の試薬。

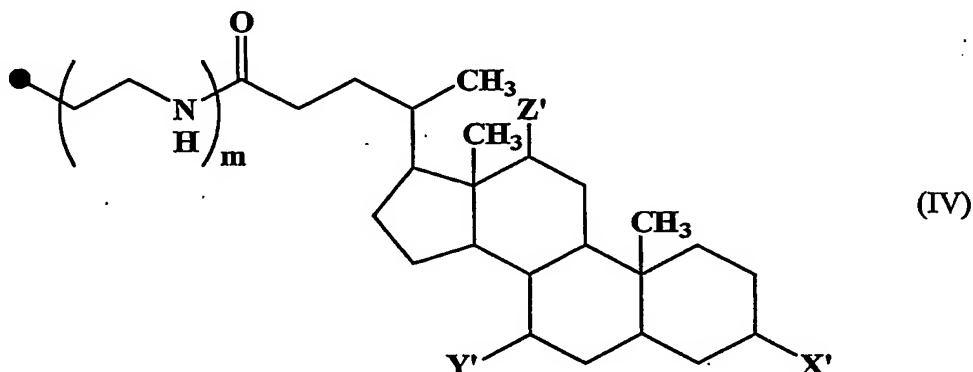
24. 非イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体が、一般式 (II)



(Xは、水素原子または水酸基を表し、 $\text{R}^3$ および $\text{R}^4$ は、同一または異なつて、置換もしくは非置換のアルキル基、または、置換もしくは非置換のアルカノイル基を表す)で表される化合物、または、一般式 (III)



{式中、X、YおよびZは、同一または異なって、水素原子、水酸基またはオキシ(=O)基を表し、Qは、酸素原子またはNHを表し、Wは、水素原子、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、アルカノイル基、アルケノイル基、アルキノイル基、置換もしくは非置換のアリール基、置換もしくは非置換のアミノアルキル基、または、一般式(IV)}



[式中、X'、Y'およびZ'は、同一または異なって、水素原子、水酸基またはオキシ(=O)基を表し、mは、0または1を表す]で表される基を表し、nは、3～400の整数を表す}で表される化合物である請求項23記載の試薬。

25. コレステロールエステル加水分解酵素を含有する第一試薬と、コレステロール酸化酵素を含有する第二試薬とを含有し、胆汁酸誘導体および過酸化水素測定用試薬を第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

26. 胆汁酸誘導体を含有する第一試薬と、コレステロールエステル加

水分解酵素およびコレステロール酸化酵素を含有する第二試薬とを含有し、過酸化水素測定用試薬を第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

27. 過酸化水素測定用試薬を含有する第一試薬と、コレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素を含有する第二試薬とを含有し、胆汁酸誘導体を第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

28. コレステロールエステル加水分解酵素を含有する第一試薬と、コレステロール脱水素酵素を含有する第二試薬とを含有し、胆汁酸誘導体および酸化型補酵素を第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

29. 胆汁酸誘導体を含有する第一試薬と、コレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール脱水素酵素を含有する第二試薬とを含有し、酸化型補酵素を第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

30. さらに、還元型補酵素測定用試薬を、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有する請求項 28 または 29 記載のキット。

31. さらに、アルブミンを、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有する請求項 25 ～ 30 のいずれかに記載のキット。

32. コレステロールエステル加水分解酵素が、化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素である請求項 25 ～ 31 のいずれかに記載のキット。

33. 化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素が、ポリエチレングリコールを主成分とする基、ポリプロピレングリコールを主成分とする基、ポリプロピレングリコールとポリエチレングリコールの共重合体を有する基、水溶性多糖類を含有する基、スルホプロピル基、スルホブチル基、ポリウレタン基、および、キレート機能を有する基からなる群より選ばれる基により修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素である請

求項 3 2 記載のキット。

34. 化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素が、ポリエチレングリコールを主成分とする基により修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素である請求項 3 2 記載のキット。

35. 胆汁酸誘導体が、陰イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体である請求項 2 5 ～ 3 4 のいずれかに記載のキット。

36. 陰イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体が、コール酸もしくはその塩、タウロコール酸もしくはその塩、グリココール酸もしくはその塩、リトコール酸もしくはその塩、デオキシコール酸もしくはその塩、ケノデオキシコール酸もしくはその塩、ウルソデオキシコール酸もしくはその塩、7-オキシリトコール酸もしくはその塩、12-オキシリトコール酸もしくはその塩、12-オキシケノデオキシコール酸もしくはその塩、7-オキシデオキシコール酸もしくはその塩、ヒオコール酸もしくはその塩、ヒオデオキシコール酸もしくはその塩、および、デヒドロコール酸もしくはその塩からなる群より選ばれる胆汁酸誘導体である請求項 3 5 記載のキット。

37. 胆汁酸誘導体が、両性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体である請求項 2 5 ～ 3 4 のいずれかに記載のキット。

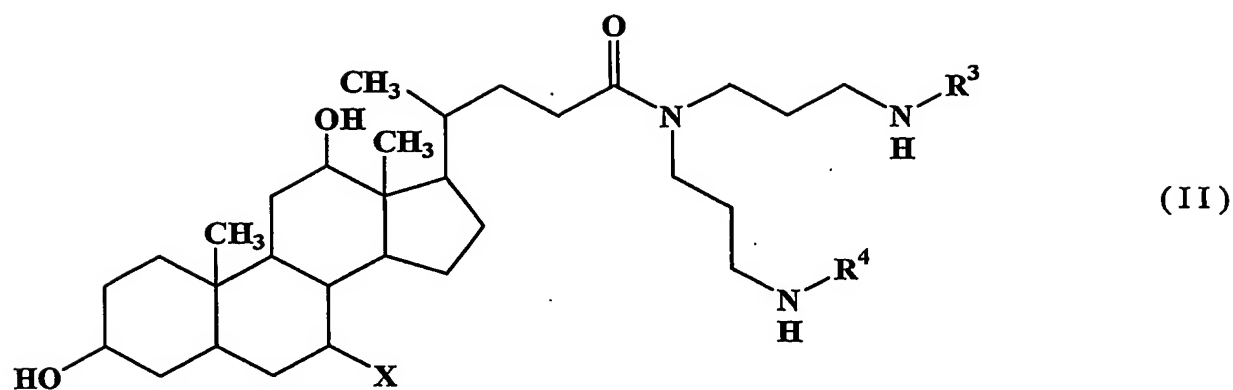
38. 両性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体が、一般式 (I)



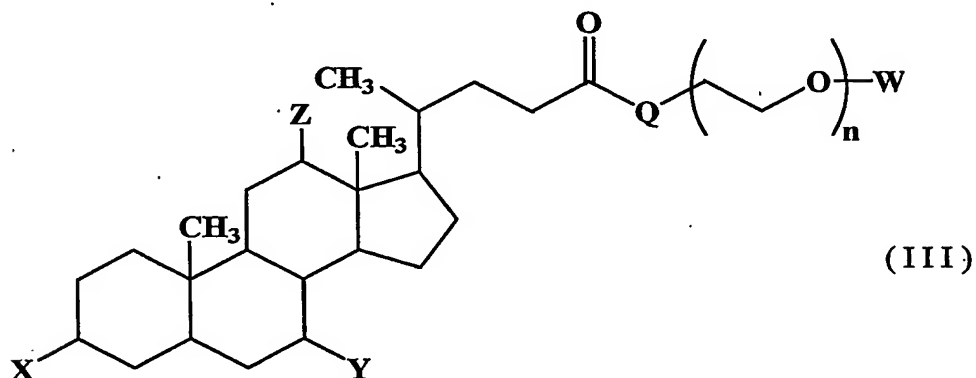
[式中、 $\text{R}^1$ は、3-(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ基であり、 $\text{R}^2$ は、水素原子または水酸基である]で表される化合物である請求項 3 7 記載のキット。

39. 胆汁酸誘導体が、非イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体である請求項 2 5 ～ 3 4 のいずれかに記載のキット。

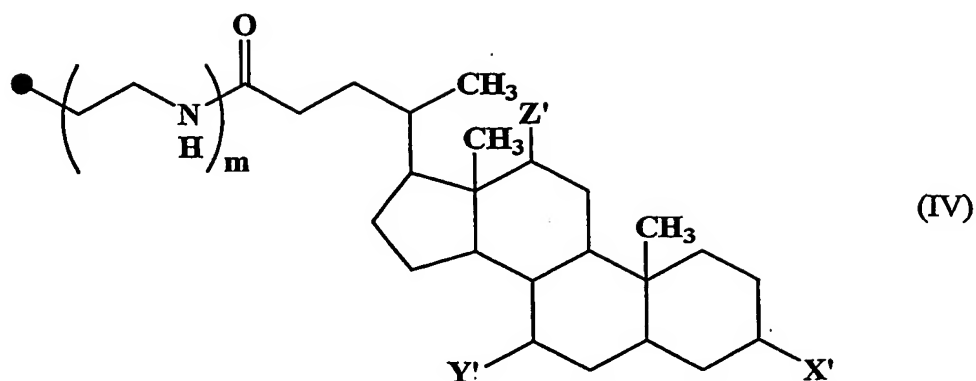
40. 非イオン性界面活性作用を有する胆汁酸誘導体が、一般式 (II)



(Xは、水素原子または水酸基を表し、 $R^3$ および $R^4$ は、同一または異なって、置換もしくは非置換のアルキル基、または、置換もしくは非置換のアルカノイル基を表す) で表される化合物、または、一般式 (III)

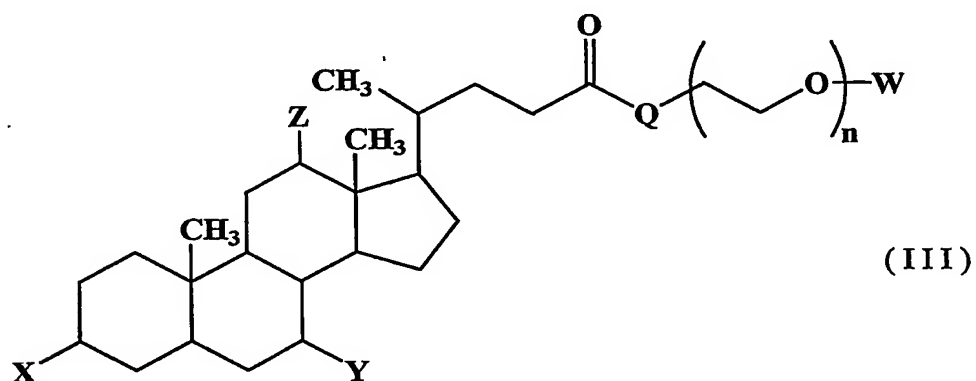


{式中、X、YおよびZは、同一または異なって、水素原子、水酸基またはオキシ(=O)基を表し、Qは、酸素原子またはNHを表し、Wは、水素原子、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、アルカノイル基、アルケノイル基、アルキノイル基、置換もしくは非置換のアリール基、置換もしくは非置換のアミノアルキル基、または、一般式 (IV)}

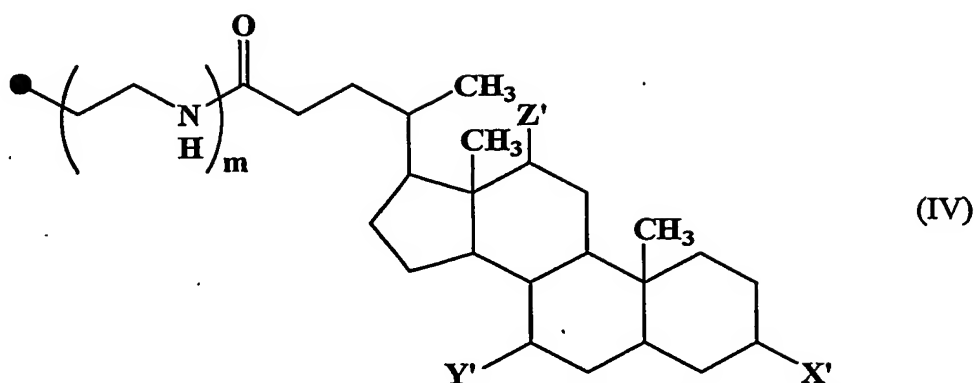


[式中、 $X'$ 、 $Y'$  および  $Z'$  は、同一または異なって、水素原子、水酸基またはオキシ ( $=O$ ) 基を表し、 $m$  は、0 または 1 を表す] で表される基を表し、 $n$  は、3 ~ 400 の整数を表す} で表される化合物である請求項 39 記載のキット。

41. 一般式 (III)

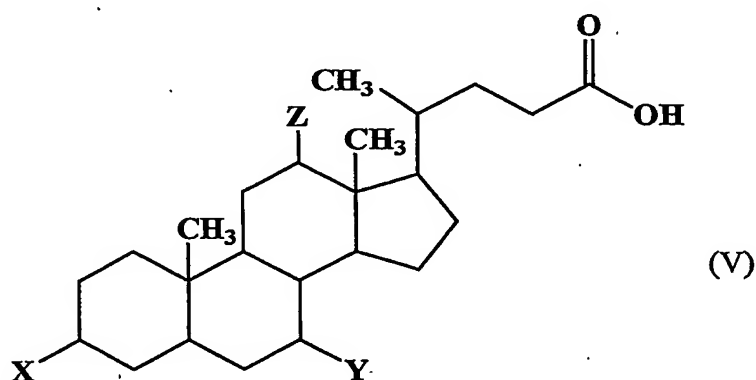


{式中、 $X$ 、 $Y$  および  $Z$  は、同一または異なって、水素原子、水酸基またはオキシ ( $=O$ ) 基を表し、 $Q$  は、酸素原子または  $NH$  を表し、 $W$  は、水素原子、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、アルカノイル基、アルケノイル基、アルキノイル基、置換もしくは非置換のアリール基、置換もしくは非置換のアミノアルキル基、または、一般式 (IV)

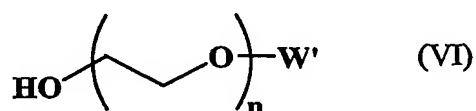


[式中、X'、Y' および Z' は、同一または異なって、水素原子、水酸基またはオキシ (=O) 基を表し、m は、0 または 1 を表す] で表される基を表し、n は、3 ~ 400 の整数を表す) で表される化合物。

42. 一般式 (V)

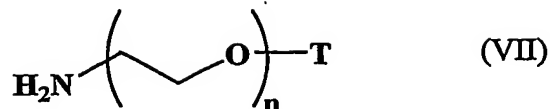


[式中、X、Y および Z は、同一または異なって、水素原子、水酸基またはオキシ (=O) 基を表す] で表される化合物と、一般式 (VI)

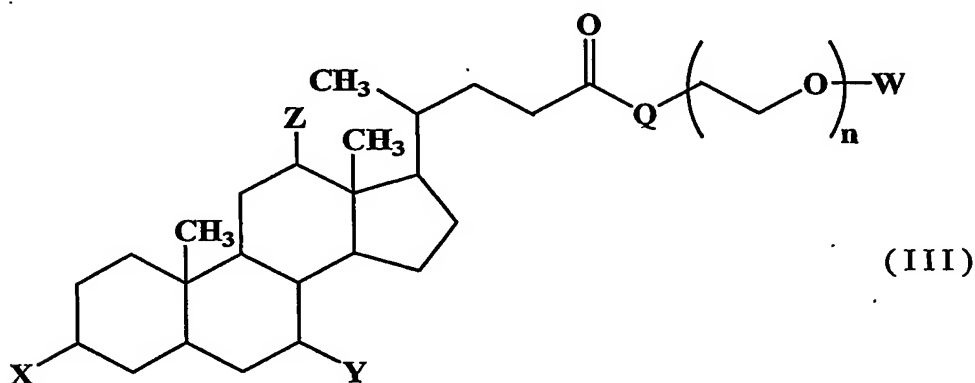


(式中、W' は、水素原子、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、アルカノイル基、アルケノイル基、アルキノイル基、または、置換もしくは非置換のアリール基を表し、n は、3 ~ 400 の整数を表す) で表される化合物、または、一般式 (VII)

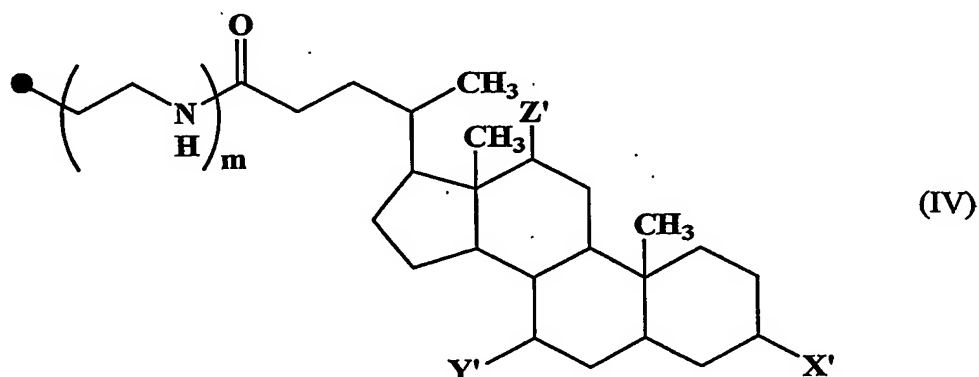




(式中、Tは、置換もしくは非置換のアミノアルキル基を表し、nは、3～400の整数を表す) で表される化合物とを、縮合剤の存在下に反応させることを特徴とする一般式 (I I I)



{式中、X、YおよびZは、同一または異なって、水素原子、水酸基またはオキシ(=O)基を表し、Qは、酸素原子またはNHを表し、Wは、水素原子、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、アルカノイル基、アルケノイル基、アルキノイル基、置換もしくは非置換のアリール基、置換もしくは非置換のアミノアルキル基、または、一般式 (I V)



[式中、X'、Y'およびZ'は、同一または異なって、水素原子、水酸基またはオキシ(=O)基を表し、mは、0または1を表す] で表される基を表し、nは、3～400の整数を表す} で表される化合物の製造方法。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13259

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/60, C12Q1/26, C12Q1/32, C12Q1/44, G01N33/92,  
C07J1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/00-3/00, G01N33/00-98, C07J1/00-75/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN), CA (STN), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	JP 08-116996 A (Toyobo Co., Ltd.), 14 May, 1996 (14.05.96), (Family: none)	1, 3-7, 12-14, 16-20, 25, 32-36/2, 8-11, 15, 21-24, 26-31, 37-40/41, 42
X/Y/A	WO 97/40376 A1 (IATRON LAB. INC.), 30 October, 1997 (30.10.97), & JP 09-537922 A	1-10, 12-23, 16-20, 25, 31-39/11, 24, 26-30, 40/41, 42

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
06 January, 2004 (06.01.04)

Date of mailing of the international search report  
03 February, 2004 (03.02.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13259

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	JP 11-009300 A (IATRON LAB. INC.), 19 January, 1999 (19.01.99), (Family: none)	1-10, 12-23, 16-20, 25, 31-39/11, 24, 26-30, 40/ 41, 42
A	WO 95/24502 A1 (KYOWA MEDEX CO. LTD.), 14 September, 1995 (14.09.95), & JP 08-131197 A & EP 699767 A1 & US 5691159 A & US 5888755 A	1-42

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International Application No.  
PCT/JP03/13259**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions according to claims 1 to 10, 12 to 23 and 25 to 39 belong to a group of invention aiming at providing an improved method for conveniently and accurately measuring cholesterol in high-density lipoproteins and a reagent and a kit therefor.

In contrast, the inventions according to claims 11, 24 and 40 to 42 belong to a group of inventions aiming at providing a compound described in claim 41.

Because of relating to different problems, these groups of inventions cannot be considered as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q 1/60, C12Q 1/26, C12Q 1/32, C12Q 1/44,  
G01N 33/92, C07J 1/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C12Q1/00-3/00, G01N33/00-98, C07J1/00-75/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN),  
CA (STN), REGISTRY (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y/A	JP 08-116996 A (東洋紡績株式会社) 1996.05.14 (ファミリーなし)	1, 3-7, 12-14, 16-20, 25, 32-36 / 2, 8-11, 15, 21-24, 26-31, 37-40 / 41, 42

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.01.2004

国際調査報告の発送日

03.2.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齊藤真由美

4B

8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

## C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y/A	WO 97/40376 A1 (IATRON LAB. INC.) 1997. 10. 30 & JP 09-537922 A	1-10, 12-23, 16-20, 25, 31-39 / 11, 24, 26-30, 40 / 41, 42
X/Y/A	JP 11-009300 A (IATRON LAB. INC.) 1999. 01. 19 (ファミリーなし)	1-10, 12-23, 16-20, 25, 31-39 / 11, 24, 26-30, 40 / 41, 42
A	WO 95/24502 A1 (KYOWA MEDEX CO. LTD.) 1995. 09. 14 & JP 08-131197 A & EP 699767 A1 & US 5691159 A & US 5888755 A	1 - 4 2

## 第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

## 第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求の範囲 1-10、12-23、25-39 に記載された発明は、高密度リポ蛋白中のコレステロールを簡便かつ正確に測定するための改良方法及びそのための測定試薬・キットを提供することを課題とする発明群である。

これに対し、請求の範囲 11、24、40-42 に記載された発明は、請求の範囲 41 に記載された化合物を提供することを課題とする発明群である。

両者は、異なる課題に関する発明群といえ、これらの発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。